



Die Erfindung betrifft ein Polypeptid (8F4-Molekül) mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen. Weiterhin betrifft die Erfindung monoklonale Antikörper gegen das 8F4-Molekül und Hybridomzellen, die die monoklonalen Antikörper herstellen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids 8F4 hemmen, insbesondere monoklonale Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten, als Arzneimittel, insbesondere zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung des 8F4-Moleküls oder von Zellen, die das 8F4-Molekül enthalten, als Arzneimittel, insbesondere zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von Substanzen, die das erfindungsgemäße Polypeptid spezifisch erkennen, insbesondere monoklonale Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten, zur Diagnose von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist.

#### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidtschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## **Ko-stimulierendes Polypeptid von T-Zellen, monoklonale Antikörper sowie die Herstellung und deren Verwendung**

5 Die Erfindung betrifft ein Polypeptid (8F4-Molekül) mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen. Weiterhin betrifft die Erfindung monoklonale Antikörper gegen das 8F4-Molekül und Hybridomzellen, die die monoklonalen Antikörper herstellen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids 8F4 hemmen, insbesondere monoklonale Antikörper,  
10 natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten, als Arzneimittel. Insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung dieser Substanzen zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen an denen das Immunsystem beteiligt ist, insbesondere zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen und zur Verhinderung der Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung des 8F4-Moleküls oder  
15 von Zellen, die das 8F4-Molekül enthalten, als Arzneimittel, insbesondere zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen an denen das Immunsystem beteiligt ist, insbesondere zur Behandlung von Krebserkrankungen, Aids, Asthmaerkrankungen oder chronischen viralen Erkrankungen wie HCV- oder HBV-Infektionen. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von Substanzen, die das erfindungsgemäße Polypeptid spezifisch erkennen,  
20 insbesondere monoklonale Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten, zur Diagnose von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist. Insbesondere betrifft die Erfindung die Diagnose mittels eines ELISA-Nachweises, einer Durchflußzytometrie, eines Western Blot, eines Radioimmunnachweises, einer Nephelometrie oder einer histochemischen Anfärbung.

25 T-Lymphozyten erkennen ihr Antigen, das von "Antigen-präsentierenden Zellen", z.B. dendritischen Zellen, B-Zellen und Makrophagen, dargeboten wird, durch ihren T-Zell-Rezeptor. Die Erkennung des Antigens durch den T-Zell-Rezeptor alleine aber reicht in den meisten Fällen nicht aus, um T-Lymphozyten ausreichend zu aktivieren. Hierzu bedarf es der  
30 zusätzlichen, gleichzeitigen Stimulation (nachfolgend auch "Ko-Stimulation" genannt) durch andere Rezeptormoleküle auf der Oberfläche der T-Lymphozyten. Eines dieser Rezeptormoleküle ist der sogenannte CD28-Rezeptor, der durch das ko-stimulierende Molekül B7 stimuliert wird. Werden diese "ko-stimulatorischen" Moleküle, z.B. CD28, wirksam, so erreicht die Aktivierung der T-Zellen nach der Erkennung des Antigens durch

den T-Zell-Rezeptor ein ausreichendes Niveau. Nach einer solchen vollständigen Aktivierung exprimiert die T-Zelle zusätzliche Moleküle, z.B. CD25, CD69, CD71, auf der Oberfläche und synthetisiert zahlreiche Zytokine, z.B. IL-2 und IFN- $\gamma$ , welche die Funktion von Botenstoffen haben. Sowohl diese zusätzlichen Oberflächenmoleküle wie auch die Zytokine dienen dem Informationsaustausch der T-Zelle mit anderen Zellen des Immunsystems. Durch die zusätzlichen Oberflächenmoleküle und die Zytokine lenken die aktivierten T-Zellen die gesamte Antigen-spezifische Immunabwehr. Auf diese Weise wird sowohl die Generierung von zytotoxischen Zellen ("Killerzellen") wie auch die Generierung von Antigen-spezifischen Antikörpern durch B-Zellen gesteuert. Zytotoxische Zellen wie auch die spezifisch gebildeten Antikörper eliminieren virale oder bakterielle Erreger, welche in den Körper eindringen. In einigen Fällen kommt es jedoch zu einem Überschießen der Immunreaktion und das Immunsystem richtet sich gegen die eigenen Körperzellen. Das führt zum Auftreten von "Autoimmunerkrankungen", z.B. zu rheumatoider Arthritis, Morbus Bechterew, Sjögren-Syndrom, Colitis ulcerosa, u.a. Einer der wesentlichen Orte der Kooperation zwischen Antigen-aktivierten T-Zellen und anderen Zellen des Immunsystems sind die sekundären lymphatischen Organe, darunter die Tonsillen. Hier werden die T-Lymphozyten durch das von dendritischen Zellen präsentierte Antigen aktiviert, hier interagieren T-Lymphozyten mit B-Zellen. Aufgrund dieser Interaktion sezernieren B-Zellen nach mehreren Zwischenstufen der Differenzierung Antigen-spezifische Antikörper vom IgM- und IgG-Typ.

20

Das am besten charakterisierte und bisher mit wirksamste ko-stimulatorische Molekül ist das CD28-Oberflächenmolekül (nachstehend CD28-Rezeptor oder CD28 genannt), das auf einem großen Teil der T-Zellen konstitutiv exprimiert wird. *In vitro* führt die Ko-Stimulation durch CD28 nach Erkennung des Antigens durch den T-Zell-Rezeptor zu einer sehr starken Erhöhung der Zytokin-Sekretion von z.B. IL-2 und IFN- $\gamma$  wie auch zu einer deutlichen Heraufregulation der Expression von Zelloberflächen-Molekülen wie CD25, CD69, CD71, welche für die Interaktion der T-Zellen mit anderen Immunzellen, z.B. B-Lymphozyten, notwendig sind; vgl. Chambers und Allison, *Current Opinion in Immunology* 9 (1997), 396-404. Durch die Ko-Stimulation über den CD28-Rezeptor läßt sich des weiteren die Proliferation der T-Lymphozyten deutlich steigern. Auch wird durch die Ko-Stimulation über den CD28-Rezeptor die T-Zell-Steuerung der B-Lymphozyten-Funktion so optimiert, daß es zu einer erhöhten Sekretion von Antikörpern kommt

30

Wenn die Funktion des CD28-Rezeptors aufgehoben wird, kommt es zu einer drastischen Funktionseinbuße der Immunabwehr. Das konnte anhand einer transgenen Maus gezeigt

werden, in der das CD28-Gen durch homologe Rekombination zerstört wurde (ein sogenannter "CD28-knock-out"). Die auf diese Weise gestörte Aktivierung der Antigen-spezifischen T-Zellen führt zu einer fehlenden Ko-Stimulation. Diese wiederum führt zu einer Störung der T-Zell-Funktion, d.h. zu einer verminderten Proliferation der T-Zellen und zu einer drastisch verminderten Synthese verschiedener Zytokine. Die fehlende Ko-Stimulation führt letztendlich zu einer verminderten Funktion der Antigen-spezifischen Immunabwehr. So wird u.a. durch das Fehlen von CD28 die Bildung Antigen-spezifischer IgG1- und IgG2-Antikörper durch B-Lymphozyten auf 10% des Normwertes reduziert; vgl. Shahinian et al., *Science* 262 (1993), 609-612; Lucas et al. *Journal of Immunology* 154 (1995), 5757-5768. Über eine Ko-Stimulation durch CD28 kann man *in vitro* auch das Eindringen des Aids-Virus in T-Lymphozyten verhindern; vgl. Riley et al., *Journal of Immunology* 158 (1997), 5545-5553. Entsprechende Versuche sind *in vivo* noch nicht durchgeführt worden. Bekanntlich schaltet CD28 viele Zytokin-Gene an, die *in vivo* zu erheblichen Nebenwirkungen führen können. Die Blockade der Rezeptoren von CD28 durch ein lösliches CTLA-4-Immunglobulin-Molekül ist im Affenmodell erfolgreich eingesetzt worden, um die Abstoßung von transplantierten Nieren zu verhindern. Hierbei wurde CTLA-4 in Kombination mit einem Antikörper gegen das CD40-Liganden-Molekül eingesetzt worden; vgl. Kirk et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 8789-8794. Die Blockade der CD28-Rezeptoren betrifft jedoch sämtliche T-Lymphozyten und nicht nur die bereits aktivierten, da CD28 auf T-Lymphozyten konstitutiv exprimiert wird.

Es besteht somit ein Bedarf an einem ko-stimulierenden Oberflächenmolekül, das nur auf aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird. Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Oberflächenmolekül auf aktivierten T-Zellen, das eine starke ko-stimulatorische Wirkung auf zentrale Funktionen der T-Lymphozyten aufweist, bereitzustellen. Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, Substanzen, z.B. monoklonale Antikörper gegen das ko-stimulatorische Oberflächenmolekül, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten des Oberflächenmoleküls bereitzustellen.

In einer ersten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen, charakterisiert dadurch, daß a) das Polypeptid auf aktivierten CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, aber nicht auf ruhenden oder aktivierten B-Zellen, Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen (natürliche Killerzellen) oder dendritischen Zellen vorkommt, und b) das Polypeptid ein Dimer ist, wobei das Polypeptid ein

Molekulargewicht von etwa 55 bis 60 kDa (Kilodalton) hat, bestimmt in einer nicht reduzierenden Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), und wobei die zwei Polypeptidketten des Polypeptids ein Molekulargewicht von etwa 27 kDa und etwa 29 kDa haben, gemessen in einer reduzierenden SDS-PAGE.

5

Das erfindungsgemäße Polypeptid (nachstehend auch 8F4-Molekül oder 8F4 genannt) wird erst nach Aktivierung der T-Lymphozyten exprimiert, und zwar sowohl auf CD4<sup>+</sup>- wie auch auf CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. In einer nicht reduzierenden SDS-PAGE weist das 8F4-Molekül ein Molekulargewicht zwischen etwa 55 und 60 kDa (Kilodalton) auf. Das 8F4-Molekül ist aus

10

zwei Peptidketten zusammengesetzt, wobei die beiden Peptidketten in einer reduzierenden SDS-PAGE ein Molekulargewicht von etwa 27 und etwa 29 kDa aufweisen. Histologisch kann man das 8F4-Antigen auf aktivierten T-Lymphozyten im lymphatischen Gewebe der Tonsillen und Lymphknoten eindeutig nachweisen, insbesondere in Keimzentren, dem Ort der Interaktion von T-Lymphozyten und B-Lymphozyten bei der Generierung von Antikörpern.

15

*Ex vivo* isolierte tonsilläre T-Zellen sind zu etwa 50-80% positiv für das 8F4-Antigen und weisen Zeichen einer fortgeschrittenen Aktivierung auf. Das 8F4-Molekül ist auf ruhenden oder aktivierten B-Zellen, Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen und dendritischen Zellen nicht nachweisbar.

Eine wichtige biologische Aktivität des 8F4-Moleküls ist seine ko-stimulierende Aktivität von T-Lymphozyten. Die ko-stimulierende Aktivität kann bestimmt werden nach Linsley, et al., *Journal of Experimental Medicine* 176 (1992), 1595-604. Die ko-stimulierende Aktivität des 8F4-Moleküls ähnelt der ko-stimulierenden Aktivität des CD28-Moleküls, welches als zentrales Verstärkungselement der Antigen-Erkennung durch das Immunsystem identifiziert

25

worden ist. Das 8F4-Molekül unterscheidet sich jedoch in vielen Aspekten von CD28. So muß die Expression des 8F4-Moleküls auf der Oberfläche der T-Zellen erst induziert werden, während CD28 konstitutiv exprimiert wird. Auch in der Funktion sind deutliche Unterschiede nachweisbar: Die Ko-Stimulation über CD28 führt zur Überexpression zahlreicher Lymphokine, u.a. des Interleukin-2 (IL-2). Auch die Ko-Stimulation über 8F4 führt zu einer verstärkten Sekretion von Lymphokinen, nicht jedoch des IL-2. Somit unterscheidet sich die ko-stimulatorische Aktivität des 8F4-Moleküls von der Aktivität des CD28-Moleküls. Da die Stimulation über 8F4 nicht alle Zytokin-Gene anschaltet, ist eine Ko-Stimulation über 8F4 *in vivo* vorteilhaft, z.B. gegenüber einer Ko-Stimulation über den CD28-Rezeptor. Auch unterscheidet sich die Induktion, die Expression, der Expressionsort und die Funktion des

30

8F4-Moleküls von allen anderen bekannten ko-stimulatorisch wirksamen Molekülen.

Bei dem erfindungsgemäßen 8F4-Molekül handelt es sich um ein neues Oberflächenmolekül auf aktivierten T-Zellen, das eine starke ko-stimulatorische Wirkung auf zentrale Funktionen der T-Lymphozyten aufweist. Die Expression *in vivo* deutet u.a. auf eine wesentliche Beteiligung des 8F4-Moleküls an der Kooperation von T-Zellen mit anderen Zellen des Immunsystems wie B-Zellen oder dendritischen Zellen im Rahmen der humoralen und zellulären Immunabwehr gegen Viren und Bakterien hin.

10 Nach Expression hat das 8F4-Molekül *in vitro* eine starke ko-stimulatorische Wirkung auf verschiedene Funktionen der T-Lymphozyten:

1. Deutliche Verstärkung der Proliferation von T-Lymphozyten.
2. Deutliche Verstärkung der Synthese bestimmter Zytokine durch die T-Lymphozyten.
- 15 3. Stark erhöhte Expression von Steuerungs-Molekülen, z.B. Oberflächenmoleküle und Zytokine, auf und in T-Lymphozyten.
4. Deutliche Verbesserung der T-Zell-induzierten Antikörper-Bildung (IgM und IgG) durch B-Zellen.

20 Die vorliegende Erfindung stellt weiterhin bereit, ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen und mit einer Aminosäuresequenz, die mindestens 40% Homologie mit der 199 Aminosäuren umfassenden Sequenz in Fig. 15 (SEQ ID NO:2) aufweist, oder ein biologisch aktives Fragment oder ein Analogon davon. Ein biologisch aktives Fragment oder Analogon ist ein Fragment oder Analogon, das ebenfalls eine ko-

25 stimulatorische Wirkung auf T-Zellen-Lymphozyten zeigt oder zumindest im Sinne einer Blockade eine biologische Wirkung entfaltet. Bevorzugt ist ein Polypeptid oder ein biologisch aktives Fragment oder Analogon davon, das mindestens 60% Homologie mit der 199 Aminosäuren umfassenden Sequenz in Fig. 15 (SEQ ID NO:2) aufweist. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfaßt das erfindungsgemäße Polypeptid eine

30 Aminosäuresequenz, die mindestens 80% Homologie mit der 199 Aminosäuren umfassenden Sequenz in Fig. 15 (SEQ ID NO:2) aufweist oder ein biologisch aktives Fragment oder Analogon davon.

Insbesondere bevorzugt ist ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation

von T-Zellen und umfassend eine Aminosäuresequenz gemäß Fig. 15 (SEQ ID NO:2), oder ein biologisch aktives Fragment oder ein Analogon davon.

Die Erfindung schließt ein allele-Varianten, Fragmente und Analoga von dem 8F4-Molekül.

5 Diese Varianten schließen ein natürlich vorkommende allele-Varianten, Substitutionsanaloga, in denen eine oder mehrere Aminosäuren substituiert worden sind mit verschiedenen Aminosäuren, Substitutionsanaloga, in denen eine oder mehrere Aminosäuren substituiert worden sind mit verschiedenen Aminosäuren, Deletionsanaloga, in denen eine oder mehrere Aminosäuren deletiert worden sind und Additionsanaloga, bei denen eine oder mehrere  
10 Aminosäuren hinzugefügt worden sind. Deletion und Addition von einer oder mehreren Aminosäuren können entweder an einer internen Region des Polypeptids oder an dem Amino- oder Carboxyterminus gemacht werden.

Erfindungsgemäße Polypeptide, fusioniert zu heterologen Polypeptiden, werden ebenfalls  
15 umfaßt.

In einer weiteren Ausführungsform bezieht sich die Erfindung auf DNA-Sequenzen, die ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder ein biologisch aktives Fragment oder Analogon davon kodieren.

20

Diese DNA-Sequenzen schließen die Sequenz gemäß SEQ ID NO:1 (Fig. 16) genauso wie allele-Varianten, Fragmente, und Analoga mit biologischer Aktivität ein.

Bevorzugt ist eine DNA-Sequenz kodierend ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität der  
25 Ko-Stimulation von T-Zellen, wobei die Sequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

- a) der DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 (Fig. 16) und ihren komplementären Strang
- b) DNA-Sequenz, hybridisierend mit den Sequenzen in (a) und
- c) DNA-Sequenzen, die aufgrund der Degeneration des genetischen Codes mit den Sequenzen  
30 in (a) und (b) hybridisieren. Vorzugsweise hybridisieren die vorstehenden DNA-Sequenzen zueinander unter stringenten Bedingungen.

Weiterhin werden bereitgestellt Vektoren, die diese DNA-Sequenzen enthalten und Wirtszellen, die mit diesen Vektoren transformiert oder transfiziert sind.



In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung monoklonale Antikörper gegen das 8F4-Molekül. Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper können auf übliche Weise nach dem von Milstein und Köhler, *Nature* 256 (1975), 495-497, beschriebenen Verfahren hergestellt werden. Insbesondere können die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper  
5 hergestellt werden, indem Mäuse mit T-Zellen, die *in vitro* mit Phorbolmyristatacetat (PMA) und Ionomycin ("2-Signal-System") für 24 h aktiviert worden sind, immunisiert werden. Die Milzzellen der immunisierten Mäuse werden mit Myelom-Zellen fusioniert. 8F4-spezifische monoklonale Antikörper werden dadurch identifiziert, daß sie 2-Signal-aktivierte, jedoch  
10 nicht ruhende T-Lymphozyten erkennen. Auch färben 8F4-spezifischen Antikörper mit einem Signal (entweder PMA oder Ionomycin) stimulierte T-Zellen in einem auf übliche Weise durchgeführten Nachweisverfahren nicht an. 8F4-spezifische Antikörper ergeben ein typisches Anfärbemuster von tonsillären T-Zellen und erkennen ein Antigen von etwa 55 bis 60 kDa in einer nicht reduzierenden SDS-PAGE und von etwa 27 kDa und etwa 29 kDa in  
15 einer reduzierenden SDS-PAGE auf aktivierten T-Lymphozyten.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Hybridomzellen, die die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper herstellen.

20 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung die Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids 8F4 hemmen, als Arzneimittel. Besonders bevorzugt ist Verwendung der erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper, natürlicher oder synthetischer Liganden, Agonisten oder Antagonisten des 8F4-Moleküls. Diese Substanzen können als Arzneimittel verwendet werden, zur Vorbeugung  
25 oder Therapie von Erkrankungen an denen das Immunsystem beteiligt ist, insbesondere zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten oder zur Verhinderung der Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen. Die Blockade der Interaktion des 8F4-Antigens mit seinem Rezeptor verbessert z.B. die Verhinderung der Organabstoßung, da eine solche Blockade nur bereits aktivierte T-Lymphozyten betrifft. Eine weitere Ausführungsform der Erfindung  
30 betrifft die Verwendung des erfindungsgemäßen Polypeptids als Arzneimittel. Insbesondere kann das erfindungsgemäße Polypeptid, zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen an denen das Immunsystem beteiligt ist, insbesondere zur Behandlung von Krebserkrankungen, Aids, Asthmaerkrankungen oder chronischen viralen Erkrankungen wie HCV-oder HBV-Infektionen verwendet werden.

Das erfindungsgemäße Polypeptid kann ebenfalls auf übliche Weise in Zellen eingeführt werden, so daß diese Zellen das Polypeptid z.B. konstitutiv exprimieren. Z.B. kann die das Polypeptid codierende Nukleinsäuresequenz oder ein Vektor, umfassend die das Polypeptid codierende Nukleinsäuresequenz, z.B. die cDNA oder genomische DNA, Promotoren, Enhancer und andere für die Expression der Nukleinsäuresequenz benötigten Elemente, in eine Zelle eingeschleust werden. Vorzugsweise wird die 8F4 cDNA (2641 Nukleotide), dargestellt in Fig. 16 (SEQ ID NO: 1), oder Fragmente oder Derivate hiervon zur Expression des erfindungsgemäßen Polypeptids oder Fragmenten hiervon eingesetzt.

10

Ferner kann das erfindungsgemäße Polypeptid z.B. mittels Liposomen in Zellen eingeführt werden, die das Polypeptid danach auf ihrer Zelloberfläche ausbilden. Erfindungsgemäß können diese Zellen als Arzneimittel verwendet werden, insbesondere zur Wiederherstellung der korrekten Regulation des menschlichen Immunsystems, wie sie im Rahmen zahlreicher chronischer Infektionserkrankungen auftritt, z.B. im Rahmen von AIDS, Asthmaerkrankungen oder bei chronischen viralen Hepatitiden (z.B. HCV, HBV), oder zur Stimulation des Immunsystems *in vitro* oder *in vivo*, wie z.B. für die Therapie von Krebserkrankungen verwendet werden.

20 In einer weiteren Ausführungsform werden Substanzen, die das erfindungsgemäße Polypeptid spezifisch erkennen, zur Diagnose von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist verwendet, wobei die Substanzen insbesondere einen monoklonalen Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten umfassen. Zur Diagnose kann z.B. ein ELISA-Nachweis, Durchflußzytometrie, Western Blot, Radioimmunassay, Nephelometrie oder eine histochemische Anfärbung verwendet werden. Die Substanzen, die das erfindungsgemäße Polypeptid erkennen, umfassen auch Nukleinsäuresequenzen, wobei diese vorzugsweise zur Hybridisierung und/oder zur Nukleinsäure-(RNA, DNA)-Amplifikation (z.B. PCR) eingesetzt werden.

30 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Substanzen, die den Signaltransduktionsweg des erfindungsgemäßen Polypeptids in die T-Zelle positiv oder negativ beeinflussen (modulieren) und die Verwendung dieser Substanzen als Arzneimittel.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Substanzen, die die

Heraufregulation des erfindungsgemäßen Polypeptids an die T-Zelloberfläche verhindern und deren Verwendung als Arzneimittel.

In einer weiteren Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Polypeptid oder Fragemente  
5 hiervon durch ein transgenes Tier exprimiert.

In einer weiteren Ausführungsform umfaßt die Erfindung ein transgenes Tier, bei dem das Gen, das für das erfindungsgemäße Polypeptid kodiert, ausgeschaltet worden ist („Knock-out“)

10

Die Abbildungen dienen der Erläuterung der Erfindung:

Fig. 1 zeigt das Ergebnis einer Immunpräzipitation des 8F4-Antigens aus aktivierten humanen T-Zellen. (a) Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE; 12% Polyacrylamidgel (PAA-Gel)) reduzierend, (b) SDS-PAGE (10% PAA-Gel) nicht  
15 reduzierend. Angegeben sind die Bedingungen zur Elution des Antigens von der 8F4-Matrix. "SDS" bedeutet Natriumdodecylsulfat; "DTT" bedeutet Dithiothreitol, "Mr" bedeutet Molekulargewicht und "kDa" bedeutet Kilodalton.

20 Fig. 2a zeigt das Ergebnis einer Durchflußzytometrie nach Induktion des 8F4-Antigens auf CD4<sup>+</sup>- T-Zellen. Die Aktivierungsdauer der T-Zellen ist in Klammern angegeben. "PMA" bedeutet Phorbolmyristatacetat; "PHA" bedeutet Phytohaemagglutinin; "OKT3" ist ein monoklonaler Antikörper gegen CD3; "MLR" bedeutet gemischte Lymphocytenreaktion (engl.: *mixed lymphocyte reaction*); "mAK 9.3" ist ein monoklonaler Antikörper gegen CD28;  
25 "SEB" bedeutet Staphylokokken Enterotoxin B.

Fig. 2b zeigt das Ergebnis einer Kinetik der Induktion des 8F4-Antigens auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen nach Aktivierung mit PMA und Ionomycin in einer Durchflußzytometrie. Aufgetragen ist die Immunfluoreszenz (log) gegen die Zellzahl.

30

Fig. 3 zeigt das Ergebnis einer Durchflußzytometrie zur Identifikation von Molekülen, welche an der Induktion von 8F4 in der "mixed lymphocyte reaction" beteiligt sind. "bio" bedeutet biotinylierter Antikörper.

Fig. 4 zeigt das Ergebnis einer histochemischen Untersuchung zur Lokalisation von 8F4-positiven Zellen in der Tonsille.

Fig. 5 zeigt das Ergebnis einer Expressions-Analyse von 8F4 auf T- und B-Zellen aus humanen Tonsillen in einer Durchflußzytometrie. "bioPE" bedeutet biotinylierter Antikörper und Streptavidin-Phycoerythrin Sekundärreagenz.

Fig. 6 zeigt die Ko-Expression des 8F4-Moleküls mit anderen Aktivierungsmarkern (CD69, CD45) in einer Durchflußzytometrie.

10

Fig. 7 zeigt schematisch die verstärkte Expression von Aktivierungsmolekülen auf T-Lymphozyten nach Ko-Stimulation durch 8F4. Offene Kreise (O) stehen für 8F4 Antikörper; Dreiecke (◆) stehen für unspezifischer Antikörper gleichen Isotyps; ausgefüllte Kreise (●) stehen für anti-CD28-Antikörper-9.3.

15

Fig. 8 zeigt einen schematischen Vergleich der ko-stimulierenden Wirkung von 8F4 mit der ko-stimulierenden Wirkung von CD28. "mAk" bedeutet monoklonaler Antikörper; "ATAC" bedeutet "Activation induced T cell derived And Chemokine related"; "cpm" bedeutet radioaktive Zerfälle pro Minute.

20

Fig. 9 zeigt schematisch die Verstärkung der Synthese der Antikörper vom IgM- und IgG-Typ durch die B-Zellen nach Ko-Stimulation von T-Zellen. "ng" bedeutet Nannogramm; "ml" bedeutet Milliliter; "mAk" bedeutet monoklonaler Antikörper.

Fig. 10 zeigt schematisch die Verhinderung der aktivierungsinduzierten Apoptose peripherer T-Zellen nach Ko-Stimulation durch 8F4.

Fig. 11 zeigt die Expression des 8F4-Antigens auf der MOLT-4V-Zelllinie. MOLT-4V-Zellen wurden mit einem Fluorescein-markierten 8F4-Antikörper (8F4-FITC) gefärbt und in der Durchflußzytometrie untersucht (offene Linie, im Vergleich zu einer Isotypkontrolle (ausgefüllte Linie)).

Fig. 12 zeigt die zweidimensionale Gelelektrophorese. Ein MOLT-4V Zell-Lysat aus  $300 \times 10^6$  Zellen wurde wie beschrieben immunpräzipitiert. Das Eluat wurde auf einer nicht

reduzierenden SDS-PAGE (10% PAA) aufgetrennt und der Bereich um 60 kDa aus dem Gel herausgeschnitten. Zur Reduktion der Disulfidbrücken im 8F4-Molekül wurde das Gelstück für 1 h bei 50°C in 5,3 M Harnstoff, 0,5 M Tris, pH 8,0, 1% SDS, 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol inkubiert und die freien Cysteinreste im Molekül mit 10 mM Iodoacetamid (Sigma, Deisenhofen) alkyliert (30 min, 37°C). Das Gelstück wurde für weitere 30 min. in 1× SDS-PAGE Probenpuffer equilibriert und auf einem 12% PAA-SDS-Gel (mit Sammelgel) montiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde das Gel einer Silberfärbung unterzogen. Die Lage des 8F4-Proteins wurde durch Oberflächeniodinierung bestimmt (vgl. Fig. 1) und ist durch Umkreisung markiert. (Alle nicht im Detail beschriebenen Prozeduren wurden nach Standardmethoden durchgeführt, siehe z.B. Westermeier, R., Electrophoresis in Practice, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1997).

Fig. 13 zeigt eine Hybridisierung mit Oligo 1 (SEQ ID NO:3). Auf Nitrocellulose-Filter immobilisierte Lamda-Klone wurden mit Oligo 1 wie in den Beispielen beschrieben hybridisiert. Dargestellt ist die Exposition auf einem Röntgenfilm (Ausschnitt).

Fig. 14 zeigt eine Northern-Blot Analyse mit der 8F4-cDNA. Die Hybridisierung eines Northern-Blots mit der 8F4-cDNA ergibt eine Bande, die im Gel zwischen der 18S und 28S RNA läuft. In Fig. 14A ist das Verhalten als 2-Signal-abhängiges (s.o.) Aktivierungsantigen gezeigt: Keine Expression in ruhenden lymphoiden Zellen (PBL), starke Expression in PMA+Ionomycin aktivierten CD4+ T-Zellen und deutlich verringerte Expression mit PMA bzw. Ionomycin alleine. Fig. 14B zeigt die Expressionsstärke der mRNA nach unterschiedlichen Stimulationszeiten (T-Zellen (über Nylonwolladhärenz aufgereinigt, NTC), stimuliert mit PMA+Ionomycin). Daneben die MOLT-4-Zelllinien (ATCC CRL-1582), die nur eine minimale Expression zeigt, ganz rechts die für die Klonierung verwendete MOLT-4V, die ein deutliches Signal zeigt. Aufgetragen ist außerdem die RNA weiterer Zelllinien, auf denen in der durchflußzytometrischen Analyse keine 8F4-Expression nachweisbar war: CEM (ATCC CCL-119), HUT-102 (ATCC TIB-162), HUT-78 (ATCC TIB-161), Jurkat (ATCC TIB-152), DG75 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) ACC83), Karpas 299 (Fischer, P. et al. (1988), Blood, 72:234-240), DEL (Barbey, S. et al. (1990), Int. J. Cancer, 45:546-553).

Fig. 15 zeigt die Aminosäuresequenz des Polypeptids 8F4 (SEQ ID NO:2).

Fig. 16 zeigt die 8F4 cDNA (SEQ ID NO:1).

Die nachstehenden Beispiele erläutern die Erfindung und sind nicht einschränkend zu verstehen.

5

#### Beispiel 1: Generierung des 8F4-Antikörpers

Balb/c Mäuse wurden mit humanen T-Zellen immunisiert, welche vorher für 24 h mit 33 ng/ml des Phorbolesters Phorbolmyristatacetat (PMA), (Sigma, Deisenhofen), und mit 200  
10 ng/ml des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophors Ionomycin (Sigma, Deisenhofen) aktiviert worden sind (sogenannte "2-Signal-Aktivierung"). Nach dreimaligem Boostern wurden die Milzzellen der Mäuse mit dem Myelom P3X63Ag8.653 (ATCC Nr.CRL-1580) fusioniert und Antikörper-sezernierende Hybridome nach Standardmethoden generiert; vgl. Peters und Baumgarten, Monoclonal Antibodies. Springer, Heidelberg, 1992. Das Durchmustern der erhaltenen  
15 Antikörper erfolgte auf aktivierten versus ruhenden T-Zellen in der Durchflußzytometrie. Aktivierte ("2-Signal-Aktivierung") und ruhende T-Zellen wurden mit dem Hybridomüberstand inkubiert und anschließend mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper markiert; vgl. Shapiro, Practical Flow Cytometry. Wiley-Liss, New York, 1995. Nur die Antikörper, welche Moleküle erkannten, die ausschließlich durch PMA und das  
20  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophors Ionomycin auf der T-Zell-Oberfläche induziert wurden, jedoch nicht durch eines der Agenzien alleine ("2-Signal-Moleküle") wurden für eine weitere Reinigung ausgewählt. Die erhaltenen Antikörper wurden in der Durchflußzytometrie auf Ähnlichkeit bzw. Verschiedenheit zu bekannten Antikörpern gegen Aktivierungsmoleküle (vgl. Tabelle 1) auf T-Zellen untersucht. Kriterien waren hierbei neben der schon oben erwähnten "2 Signal-  
25 Abhängigkeit" die Kinetik der Induktion auf stimulierten T-Zellen und die Expression auf verschiedenen Zelllinien.

#### Beispiel 2: Immunpräzipitation des 8F4-Antigens

30 Oberflächenmoleküle von aktivierten humanen T-Zellen wurden mit  $^{125}\text{I}$  nach Standardmethoden iodiniert und mit dem Antikörper 8F4 nach Standardmethoden immunpräzipitiert; vgl. Goding, Monoclonal Antibodies: Principle and Practice. Academic Press, London, 1996. Für die Immunpräzipitation wurde der Antikörper nach Schneider et al., *Journal of Biological Chemistry* 257 (1982), 10766-10769, an Protein G (Pharmacia,  
35 Freiburg) gekoppelt (8F4-Matrix). Das Waschen der Matrix erfolgte nach Schneider et al.,

siehe vorstehend. Das immunpräzipitierte 8F4-Molekül wurde auf übliche Weise in der SDS-PAGE (nicht reduziert und reduziert) auf seine molekulare Masse analysiert; Goding, siehe vorstehend.

5 Beispiel 3: Durchflußzytometrie

Die Analyse der 8F4-tragenden T-Zellen in der Durchflußzytometrie erfolgte nach Standardmethoden; vgl. Shapiro, Practical Flow Cytometry. Wiley-Liss, New York, 1995.

10 Ausführungsbeispiel 3.1: Durchflußzytometrie nach Induktion des 8F4-Antigens auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen.

CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus dem peripheren Blut wurden mit verschiedenen Agenzien in üblicher Weise stimuliert und auf Expression des 8F4-Moleküls in der Durchflußzytometrie nach  
15 üblichem Verfahren untersucht. Die Aktivierungsdauer der T-Zellen betrug mit den verschiedenen Agenzien zwischen 24 Stunden und 144 Stunden. Aktivierungsmodi: Phorbolmyristatacetat (PMA; 33 ng/ml), Ionomycin (200ng/ml), Phytohaemagglutinin (PHA 1,5 mg/ml), OKT3 (monoklonaler Antikörper gegen CD3), gemischte Lymphocytenreaktion (MLR, "mixed lymphocyte reaction" zwischen 50 000 CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und 100 000 B-Zellen),  
20 mAk 9.3 (monoklonaler Antikörper gegen CD28), Staphylokokken Enterotoxin B (SEB, 0,1 ng/ml). Die Auswertung ergab, daß verschiedene Stimuli geeignet sind, das 8F4-Molekül auf T-Zellen zu induzieren, jedoch in unterschiedlicher Expressionsdichte. Am potentesten sind neben den stark wirksamen pharmakologischen Agenzien PMA und Ionomycin solche Stimuli, die eine ko-stimulatorische Situation darstellen, wie z.B. akzessorische Zellen in der  
25 MLR oder der ko-stimulierende mAk 9.3.

Ausführungsbeispiel 3.2: Kinetik der Induktion des 8F4-Antigens auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen nach Aktivierung mit PMA und Ionomycin.

30 CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus dem peripheren Blut wurden mit PMA (33 ng/ml) und Ionomycin (200 ng/ml) in üblicher Weise stimuliert und nach 0, 4, 8, 12, 24 und 48 Stunden auf die Expression des 8F4-Moleküls in der Durchflußzytometrie in üblicher Weise untersucht. Das Molekül ist bereits nach vier Stunden auf der Oberfläche detektierbar, gehört also zur Klasse der relativ frühen Aktivierungsantigene. Auch nach 48 Stunden wird das Antigen noch gut

exprimiert.

Ausführungsbeispiel 3.3: Durchflußzytometrie zur Identifikation von Molekülen, welche an der Induktion von 8F4 in der "mixed lymphocyte reaction" beteiligt sind.

5

50 000 CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus dem peripheren Blut wurden mit 100 000 allogenen tonsillären B-Zellen für 6 Tage ko-kultiviert (37°C, 5,2% CO<sub>2</sub>, 200 µl RPMI 1640 mit 10% FCS in 96-Well-Rundbodenplatten) und danach auf die Expression des 8F4-Moleküls in der Durchflußzytometrie untersucht. Zu Beginn der Kultivierung wurden verschiedene Antikörper (anti-CD80, anti-CD86, anti-MHCII; alle 10 mg/ml) der Kultur hinzugefügt, um die Abhängigkeit der 8F4-Induktion von diesen Molekülen zu überprüfen. Die Expression von 8F4 läßt sich nur durch Blockade der CD86/CD28-Interaktion blockieren, nicht jedoch durch Blockade von CD80. Der Blockade-Effekt ist hierbei noch stärker als die Blockade von MHCII (Positivkontrolle).

15

Ausführungsbeispiel 3.4: Expression von 8F4 auf T- und B-Zellen aus humanen Tonsillen. B-Zellen bzw. T-Zellen aus tonsillärem Gewebe von verschiedenen Quellen wurden auf übliche Weise gereinigt und in der Durchflußzytometrie auf die Expression des 8F4-Moleküls untersucht. Während auf B-Zellen das Signal nicht eindeutig signifikant war, exprimierten etwa 50-80% der tonsillären T-Zellen das 8F4-Molekül in unterschiedlicher Dichte. Es lassen sich hierbei zwei Populationen unterschiedlich hoher Fluoreszenz (8F4-"high" bzw. -"low") erkennen, deren Ausprägung bei den verschiedenen Tonsillen unterschiedlich ist. So weist z.B. Tonsillen eine ausgeprägte 8F4-"low"- und andere Tonsillen eine ausgeprägte 8F4-"high"-Population auf.

25

Ausführungsbeispiel 3.5: Ko-Expression des 8F4-Moleküls mit anderen Aktivierungsmarkern.

Aus humanen Tonsillen gereinigte T-Zellen wurden in der 2-Farben-Durchflußzytometrie auf die Ko-Expression des 8F4-Moleküls mit anderen Aktivierungsmarkern analysiert. In Tonsillen wird 8F4 ko-exprimiert mit CD69 wie auch mit Varianten des CD45-Moleküls. Hierbei sind die 8F4-"high"-Zellen eindeutig mit einer CD45RO-Expression korreliert, während die 8F4-negativen Zellen den Phänotyp CD45RA tragen. CD45RA wird hauptsächlich von sogenannten "naiven" T-Zellen exprimiert, wohingegen CD45RO mit einer Effektorzellfunktion assoziiert ist. Es handelt sich also bei den 8F4<sup>+</sup>-Zellen hauptsächlich um

30



"reife" T-Zellen. CD45RO und CD45RA sind Isoformen von CD45.

Beispiel 4: Lokalisation von 8F4-positiven Zellen in der Tonsille.

- 5 Tonsilläres Gewebe in Gefrierschnitten wurde mit dem 8F4-Antikörper in der APAAP-Technik (alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase) nach Standardverfahren angefärbt. 8F4<sup>+</sup>-Zellen wurden vorzugsweise im Keimzentrum der Tonsillen vorgefunden, aber z. T. auch in der T-Zell-Zone der Tonsillen.

10 Beispiel 5: Ko-Stimulation von T-Lymphozyten

- 96-Well-Platten wurden mit einem Ziegen-anti-Maus-Ig-Antikörper beschichtet (20 µg/ml), gewaschen, und mit dem anti-CD3 monoklonalen Antikörper OKT3 (verschiedene Verdünnungen eines Aszites) und dem erfindungsgemäßen 8F4-Antikörper (2 µg/ml)  
15 beladen. Als Isotypkontrolle wurden der OKM1 Antikörper oder der 2A11 Antikörper (beide 2 µg/ml) verwendet.

Ausführungsbeispiel 5.1: Verstärkte Expression von Aktivierungsmolekülen auf T-Lymphozyten nach Ko-Stimulation durch 8F4.

20

- Gereinigte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus dem peripheren Blut wurden mit verschiedenen Konzentrationen des monoklonalen Antikörpers OKT3 aktiviert und gleichzeitig mit dem 8F4-Antikörper oder einem unspezifischen Antikörper gleichen Isotyps ko-stimuliert. Als Vergleich wurde die Kostimulation mit dem anti-CD28-Antikörper-9.3, einem der stärksten  
25 bekannten ko-stimulatorischen Antikörper, durchgeführt. Selbst bei optimaler Stimulation über CD3 ist sowohl mit dem mAk 8F4 als auch mit mAk 9.3 noch ein Ko-stimulatorischer Effekt zu sehen. Im suboptimalen OKT3-Bereich, d.h. dem Bereich, in dem ohne Ko-stimulation keine volle T-Zellaktivierung mehr erzielt werden kann, können beide Antikörper die Expression anderer Aktivierungsantigene um den Faktor 4 bis 100 steigern, wobei die  
30 Wirkung des anti-CD28-Antikörpers auch noch bei sehr hohen OKT3-Verdünnungen sichtbar wird. Dies ist darauf zurückzuführen, daß bei sehr schwacher OKT3-Stimulation das 8F4-Antigen nicht mehr auf die Zelloberfläche gebracht und somit auch nicht vom mAk 8F4 kreuzvernetzt werden kann.

Ausführungsbeispiel 5.2: Vergleich der ko-stimulierenden Wirkung von 8F4 mit der ko-stimulierenden Wirkung von CD28.

Gereinigte CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wurden für 51 h mit einer suboptimalen Konzentration des monoklonalen Antikörpers OKT3 stimuliert. Als Ko-Stimulatoren wurden Antikörper 8F4, Antikörper 9.3 (anti-CD28) und Isotypkontrollen eingesetzt (jeweils 2 µg/ml). Nach Ablauf der Stimulationsdauer wurde die Proliferationsrate der T-Zellen durch <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau bestimmt. In Parallelkulturen wurde der Überstand entfernt und die Konzentration der Zytokine ATAC/Lymphotoxin und IL-2 bestimmt. Bezüglich der IL-2-Synthese unterscheiden sich 8F4 und CD28 sehr stark voneinander. CD28-Ko-Stimulation führt, wie auch im Stand der Technik beschrieben (Chambers und Allison, *Current Opinion in Immunology* 9 (1997), 396-404), zu einer sehr starken IL-2 Sekretion. Mit 8F4 hingegen liegt die IL-2 Produktion unterhalb der Nachweisgrenze. Die Proliferation ist jedoch in beiden Ansätzen vergleichbar, das autokrine Wachstum der T-Zellen muß also bei 8F4-Ko-Stimulation auf andere Faktoren zurückgeführt werden. Auch in bezug auf die Sekretion des Lymphokins ATAC unterscheiden sich die beiden Antikörper in der ko-stimulatorischen Wirkung kaum.

Beispiel 6: Bestimmung der von B-Zellen synthetisierten Immunglobuline nach Interaktion mit 8F4-ko-stimulierten T-Zellen

96-Well-Platten wurden mit einem Ziegen-anti-Maus-Ig-Antikörper beschichtet (20 µg/ml), gewaschen, und mit dem anti-CD3 monoklonalen Antikörper OKT 3 (1:500 bis 1:80 000 Aszites) und dem erfindungsgemäßen 8F4-Antikörper (2 µg/ml) beladen. Als Isotypkontrolle wurde der OKM1-Antikörper oder der 2A11-Antikörper verwendet. In einigen Experimenten wurde zum Vergleich eine Ko-Stimulation mit einem CD28-spezifischen Antikörper ("9.3") durchgeführt; vgl. Hara et al., *Journal of Experimental Medicine* 161 (1985), 1513-1524. In die so vorbehandelten Kulturplatten wurden pro well 50 000 gereinigte (Magnetobeads, Dynal, Hamburg) CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (>95% Reinheit) aus dem peripheren Blut und 25 000 allogene tonsilläre B-Zellen (negativ-Selektion durch T-Zell-Rosettierung mit Schafserythrocyten, 96% Reinheit) pipettiert und für 8 Tage ko-kultiviert. Nach dieser Zeitdauer wurde der Überstand entnommen und auf die Konzentration sezernierter Immunglobuline vom IgM- und IgG-Typ im ELISA auf übliche Weise analysiert; vgl. Nishioka and Lipsky, *Journal of Immunology* 153 (1994), 1027-1036.

Ausführungsbeispiel 6.1: Verstärkung der Synthese der Antikörper vom IgM- und IgG-Typ durch die B-Zellen nach Ko-Stimulation von T-Zellen.

5 Gereinigte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus dem peripheren Blut wurden für 8 Tage mit allogenen B-Zellen aus Tonsillen in üblicher Weise ko-kultiviert. Bei einer suboptimalen Stimulation der T-Zellen mit dem OKT3-Antikörper verstärkt die Ko-Stimulation der T-Zellen durch 8F4 die Sekretion der IgM- und IgG-Immunglobuline um den Faktor 40.

10 Beispiel 7: Verhinderung der aktivierungsinduzierten Apoptose peripherer T-Zellen nach Ko-Stimulation durch 8F4.

Periphere T-Zellen (über Nylonwolladhärenz in üblicher Weise aufgereinigt) wurden für 20 h mit PHA (1.5 mg/ml) stimuliert und über 6 Tage mit IL-2 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch OKT3 mit und ohne Ko-Stimulation durch mAk 8F4 (2 µg/ml) restimuliert. Die Apoptose wurde durch Anfärbung der DNA mit Propidiumiodid in der Durchflußzytometrie (FACS) bestimmt. Bei suboptimaler Stimulation über den T-Zellrezeptor-Komplex kann Ko-Stimulation über 8F4 den Anteil apoptotischer Zellen um den Faktor 4 senken.

20 Beispiel 8: Klonierung der für das 8F4-Protein kodierenden cDNA

Durch Färbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten 8F4 Antikörper wurde in der Durchflußzytometrie eine Zelllinie (MOLT-4V) identifiziert, die das 8F4-Antigen konstitutiv exprimiert (Fig. 11). Bei der Linie MOLT-4V handelt es sich um eine Variante der humanen T-Zelllinie MOLT-4 (American Type Culture Collection (ATCC) CRL-1582).

25 Diese Zelllinie wurde für die präparative Aufreinigung des 8F4-Antigens mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers verwendet:

Die Zellen wurden im großen Maßstab (150 l) in Rollerkulturflaschen kultiviert, abzentrifugiert und die zellulären Proteine mit einem Lysepuffer (50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF (Sigma, Deisenhofen), 1% NP-40 (Boehringer, Mannheim)) extrahiert. Zellkerne und andere unlösliche Bestandteile wurden durch Ultrazentrifugation entfernt. Das so gewonnene Zell-Lysat wurde für 2 h mit Sepharose CL4-B (Pharmacia, Freiburg) präinkubiert, um unspezifisch an Sepharose bindende Proteine zu entfernen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit der bereits in Beispiel 2 beschriebenen

8F4-Immunaффinitätsmatrix (4 h bei 4°C). Die Matrix wurde in eine Säule gefüllt und nun mehrfach unter Bedingungen gewaschen, die eine ausschließliche Entfernung von unspezifisch bindenden Proteinen bedingt (1. 50 mM Tris, pH 8,0, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,5% NP-40; 2. 50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,5% NP-40, 0,1% SDS; 3. 0,2 M Glycin pH 4,0, 0,5% CHAPS (Merck, Darmstadt)). Die Elution des 8F4-Antigens von der Matrix erfolgte mit 0,2 M Glycin, pH 2,5, 0,5% CHAPS. Das Eluat wurde durch Ultrafiltration eingeengt (Amicon Centricon 10, Millipore, Eschborn).

Um eine weitere Aufreinigung des 8F4 Moleküls zu erzielen, wurde die dimere Struktur des Moleküls (siehe Fig. 1) in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese (nicht reduzierend/reduzierend) ausgenutzt: Da die meisten Proteine als Monomer vorkommen, laufen sie in der Gelelektrophorese auf einer Diagonale, das 8F4-Molekül dagegen läuft in der 1. Dimension (nicht reduzierend) bei 55-60 kDa und in der 2. Dimension (reduzierend) bei 27 und 29 kDa (Fig. 12).

Für die präparative Auftrennung wurden die Immunpräzipitate von jeweils  $20 \times 10^9$  Zellen wie vorstehend bei der Beschreibung der Fig. 12 dargestellt in der Zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt, das Gel mit Coomassie Blau G250 (Biorad, München) gefärbt und die in Fig. 12 bezeichneten Areale aus dem Gel getrennt ausgeschnitten (8F4-27kDa bzw. 8F4-29 kDa).

Für die Peptidmikrosequenzierung wurden die Proteine aus jeweils 4 Gelstücken mit Trypsin verdaut und aus dem Gel eluiert. Die tryptischen Fragmente wurden über HPLC aufgetrennt und einzelne Fraktionen einer Edman-Degradation unterzogen (Verfahren ausführlich beschrieben in Groettrup, M. et al. (1996), Eur. J. Immunol., 26:863-869).

Aus der Sequenzierung der 8F4-29kDa Probe wurde neben Bruchstücken bekannter Proteine eine Peptidsequenz XRLTDVT gefunden, für die in sämtlichen Proteindatenbanken kein Korrelat im humanen Bereich gefunden wurde.

30

Eine eindeutige Rückübersetzung einer Proteinsequenz in eine DNA-Sequenz ist nicht möglich. So ergibt die Rückübersetzung der obigen Peptidsequenz in ein Oligonucleotid mit 17 Nucleotiden eine Zahl von 2048 Permutationen. Ein spezielles Verfahren (Wozney, J.M. (1990), Methods Enzymol. 182:738-751) ermöglicht jedoch das Screening einer cDNA Bank

mit degenerierten Oligonucleotiden. Auf Basis der gefundenen Peptidsequenz wurden 2 Oligonucleotide (Oligo 1 (SEQ ID NO:3): MGN CTS ACN GAY GTN AC, 512 Permutationen; Oligo 2 (SEQ ID NO:4): MGN YTD ACN GAY GTN AC, 1024 Permutationen) synthetisiert.

5

Für das Screening wurde eine cDNA Bank aus der auch für die Proteinaufreinigung verwendeten MOLT-4V Zelllinie konstruiert:

Gesamt-RNA wurde nach der Guanidinium/CsCl-Methode (Chirgwin, J.M. et al. (1979), Biochemistry 18:5294-5299) isoliert, mRNA über Oligo-dT-Cellulose-Säulen (Gibco BRL, Eggenstein) angereichert. Die Erst- und Zweit-Strang cDNA Synthese wurde unter Verwendung eines kommerziellen cDNA-Synthesystems (Gibco BRL, Eggenstein) unter Verwendung von Oligo-dT-Primern nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die cDNA wurde über EcoRI-Adaptoren in den Lambda ZAPII Vektor (Stratagene, Heidelberg) ligiert.

15

Die cDNA-Bank wurde gemäß Standardmethoden (Vogeli, G. and Kaytes, P.S. (1987), Methods Enzymol., 152:407-515) plattiert und die Lambda-DNA auf Nitrocellulose-Filtern (Optitran BA-S 85, Schleicher & Schuell, Dassel) immobilisiert.

Die oben genannten Oligonucleotide wurden unter Verwendung von T4 Polynucleotidkinase (NEBL, Schwalbach) und  $\gamma$ -<sup>32</sup>P ATP (NEN Du Pont, Brüssel) radioaktiv markiert (Wallace, R.B. and Miyada, C.G. (1987), Methods Enzymol., 152:432-442).

Die Hybridisierung der Filter erfolgte in einem für degenerierte Oligonucleotide beschriebenen Puffer (Wozney, J.M. (1990), Methods Enzymol. 182:738-751) mit 3 M Tetramethylammoniumchlorid (Roth, Karlsruhe) bei 48°C. Die Filter wurden, wie in der o.g. Referenz beschrieben, gewaschen, wobei die Waschttemperatur 50°C betrug. Nach Exposition der Filter auf einem Röntgenfilm zeigten sich ca. 50 positive Klone pro 100 000 plattierter Phagen (Fig. 13).

6 Klone wurden weiter charakterisiert, indem sie nach der vom Hersteller des Vektors (Stratagene, Heidelberg) beschriebenen Methode durch in vivo Excision in einen Plasmidvektor überführt wurden und mit T3 und T7 Primern ansequenziert wurden (BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Foster City, USA). Einer der Klone enthielt eine Sequenz, deren Translation genau die gesuchte Peptidsequenz ergab. Dieser Klon

wurde zur Hybridisierung eines Northern Blots (Fig. 14) verwendet (KroczeK, R.A. (1993), J. Chromatogr., 618, 133-145). Das Expressionsmuster der mRNA entsprach genau der Expression des 8F4-Moleküls, wie es aus durchflußzytometrischen Untersuchungen mit dem monoklonalen Antikörper bekannt war. Da der gefundene Klon nur das 3'-Ende der gesuchten  
5 cDNA enthielt, wurde ein 5'-gelegenes Fragment zur Isolierung der gesamten 8F4 cDNA verwendet. Mehrere Klone wurden auf beiden Strängen sequenziert.

Die 8F4 cDNA (2641 Nucleotide) ist in Fig. 16 und im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO:1 dargestellt und codiert für ein Protein mit 199 Aminosäuren (Nucleotide 68-664), dargestellt  
10 in Fig. 15 und im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO:2. Die Sequenzierung mehrerer unabhängiger Klone aus der cDNA-Bank ergab einige Abweichungen von der hier gezeigten Sequenz, die jedoch alle in der 3'-untranslatierten Region liegen:

Pos. 909-910: Deletion

Pos. 1631: T->C

15 Pos. 2074: G->T

Pos. 2440: G->C

Pos. 2633: alternative Polyadenylierungsstelle

Tab.1:

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die verwendeten Antikörper (Klon), deren Herkunftsquelle  
 5 (Quelle), die Spezifität gegen ihr jeweiliges Antigen (Spezifität) und gegebenenfalls ihre  
 Markierung (Label) wider.

Spezifität	Label	Isotyp	Klon	Quelle
CD3	Cy-Chrome	IgG1	UCHT1	Pharmingen, Hamburg
CD3	-	IgG2a	OKT3	ATCC CRL-8001
CD11b	-	IgG2b	OKM1	ATCC CRL-8026
CD25	FITC	IgG2a	B1.49.9	Immunotech, Hamburg
CD28	-	IgG2a	9.3	Immunex Corp., Seattle
CD45RA	Cy-Chrome	IgG2b	HI100	Pharmingen, Hamburg
CD45RO	FITC	IgG2a	UCLH1	Immunotech, Hamburg
CD69	FITC	IgG1	FN50	Pharmingen, Hamburg
CD80	-	IgG1	L307.4	Becton Dickinson, Heidelberg
CD86	-	IgG2b	IT2.2	Pharmingen, Hamburg
CD154	FITC	IgG1	TRAP-1	Hybridom <sup>1</sup>
MHCII	-	IgG2a	L243	ATCC HB-55
8F4	-	IgG1	8F4	Hybridom <sup>1</sup>
8F4	Biotin	IgG1	8F4	Hybridom <sup>1</sup>
Isotyp IgG1	-	IgG1	2A11	Hybridom <sup>1,2</sup>
Isotyp IgG1	FITC	IgG1	2A11	Hybridom <sup>1,2</sup>
Isotyp IgG1	Biotin	IgG1	ASA-1	Hybridom <sup>1</sup>

10 <sup>1</sup> Die Hybridomzelllinie wurde auf übliche Weise generiert, der Antikörper aufgereinigt und gegebenenfalls  
 markiert.

<sup>2</sup> gerichtet gegen ein synthetisches Peptid

Die in den Beispielen verwendeten Antiseren und Sekundärreagenzien wurden bezogen von:  
 Ziege-anti-Maus-Ig, FITC-konjugiert, von Jackson Immuno Research Lab., USA;  
 15 Streptavidin, PE-konjugiert, von Jackson Immuno Research Lab., USA; Kaninchen-anti-  
 Maus-Ig-Fraktion, von Sigma, Deisenhofen.

SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

5

## (i) ANMELDER:

(A) NAME: Bundesrepublik Deutschland, letztvertreten  
durch

10

den Direktor des Robert-Koch-Instituts

(B) STRASSE: Nordufer 20

(C) ORT: Berlin

(D) BUNDESLAND: Berlin

(E) LAND: Deutschland

15

(F) POSTLEITZAHL: 13353

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Ko-stimulierendes Polypeptid von T-  
Zellen, monoklonale Antikörper sowie die Herstellung und deren Verwendung

20

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 4

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRAEGER: Floppy disk

25

(B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (v) DATEN DER JETZIGER ANMELDUNG:

30

ANMELDENUMMER:

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

35

(A) LÄNGE: 2641 Basenpaare

(B) ART: Nucleotide

(C) STRANGFORM: Doppelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: cDNA

40

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CGAGAGCCTG AATTCACGTG CAGCTTTGAA CACTGAACGC GAGGACTGTT AACTGTTTCT 60

45

GGCAAACATG AAGTCAGGCC TCTGGTATTT CTTTCTCTTC TGCTTGCGCA TTAAAGTTTT 120

AACAGGAGAA ATCAATGGTT CTGCCAATTA TGAGATGTTT ATATTCACA ACGGAGGTGT 180

50

ACAAATTTTA TGCAAATATC CTGACATTGT CCAGCAATTT AAAATGCAGT TGCTGAAAGG 240

GGGGCAAATA CTCTGCGATC TACTAAGAC AAAAGGAAGT GGAAACACAG TGTCCATTAA 300

GAGTCTGAAA TTCTGCCATT CTCAGTTATC CAACAACAGT GTCTCTTTTT TTCTATACAA 360

55

CTTGGACCAT TCTCATGCCA ACTATTACTT CTGCAACCTA TCAATTTTGT ATCCTCCTCC 420

TTTTAAAGTA ACTCTTACAG GAGGATATTT GCATATTTAT GAATCACAAC TTTGTTGCCA 480

GCTGAAGTTC TGTTACCCA TAGGATGTGC AGCCTTTGTT GTAGTCTGCA TTTTGGGATG 540

60

CATACTTATT TGTTGGCTTA CAAAAAGAA GTATTCATCC AGTGTGCACG ACCCTAACGG 600



	TGAATACATG	TTCATGAGAG	CAGTGAACAC	AGCCAAAAAA	TCTAGACTCA	CAGATGTGAC	660
	CCTATAATAT	GGAACCTCTGG	CACCCAGGCA	TGAAGCACGT	TGGCCAGTTT	TCCTCAACTT	720
5	GAAGTCAAG	ATTCTCTTAT	TTCCGGGACC	ACGGAGAGTC	TGACTTAACT	ACATACATCT	780
	TCTGCTGGTG	TTTTGTTCAA	TCTGGAAGAA	TGACTGTATC	AGTCAATGGG	GATTTTAAAC	840
	GACTGCCTTG	GTAAGTCCGA	GTCTCTCTCA	AACAAACACC	CTCTTGCAAC	CAGCTTTGGA	900
10	GAAAGCCAG	CTCCTGTGTG	CTCACTGGGA	GTGGAATCCC	TGTCTCCACA	TCTGCTCCTA	960
	GCAGTGCATC	AGCCAGTAAA	ACAAACACAT	TTACAAGAAA	AATGTTTAA	AGATGCCAGG	1020
15	GGTACTGAAT	CTGCAAAGCA	AATGAGCAGC	CAAGGACCAG	CATCTGTCCG	CATTTCACTA	1080
	TCATACTACC	TCTTCTTTCT	GTAAGGATGA	GAATTCCTCT	TTTAATCAGT	CAAGGGAGAT	1140
	GCTTCAAAGC	TGGAGCTATT	TTATTTCTGA	GATGTTGATG	TGAAGTGTAC	ATTAGTACAT	1200
20	ACTCAGTACT	CTCCTTCAAT	TGCTGAACCC	CAGTTGACCA	TTTTACCAAG	ACTTTAGATG	1260
	CTTTCTTG TG	CCCTCAATTT	TCTTTTAA	AATACTCTA	CATGACTGCT	TGACAGCCCA	1320
25	ACAGCCACTC	TCAATAGAGA	GCTATGTCTT	ACATTCTTTC	CTCTGCTGCT	CAATAGTTTT	1380
	ATATATCTAT	GCATACATAT	ATACACACAT	ATGTATATAA	AATTCATAAT	GAATATATTT	1440
	GCCTATATTC	TCCCTACAAG	AATATTTTGT	CTCCAGAAAG	ACATGTTCTT	TTCTCAAATT	1500
30	CAGTTAAAT	GGTTTACTTT	GTTCAAGTTA	GTGGTAGGAA	ACATTGCCCG	GAATTGAAAG	1560
	CAAATTTATT	TTATTATCCT	ATTTTCTACC	ATTATCTATG	TTTTCATGGT	GCTATTAATT	1620
35	ACAAGTTTAG	TTCTTTTGT	AGATCATATT	AAAATTGCAA	ACAAAATCAT	CTTTAATGGG	1680
	CCAGCATTCT	CATGGGGTAG	AGCAGAATAT	TCATTTAGCC	TGAAAGCTGC	AGTTACTATA	1740
	GGTTGCTGTC	AGACTATACC	CATGGTGCCT	CTGGGCTTGA	CAGGTCAAAA	TGGTCCCCAT	1800
40	CAGCCTGGAG	CAGCCCTCCA	GACCTGGGTG	GAATTCCAGG	GTTGAGAGAC	TCCCCTGAGC	1860
	CAGAGGCCAC	TAGGTATTCT	TGCTCCCAGA	GGCTGAAGTC	ACCCTGGGAA	TCACAGTGGT	1920
45	CTACCTGCAT	TCATAATTCC	AGGATCTGTG	AAGAGCACAT	ATGTGTCAGG	GCACAATTCC	1980
	CTCTCATAAA	AACCACACAG	CCTGGAAATT	GGCCCTGGCC	CTTCAAGATA	GCCTTCTTTA	2040
	GAATATGATT	TGGCTAGAAA	GATTCTTAAA	TATGTGGAAT	ATGATTATTC	TTAGCTGGAA	2100
50	TATTTTCTCT	ACTTCCTGTC	TGCATGCCCA	AGGCTTCTGA	AGCAGCCAAT	GTCGATGCAA	2160
	CAACATTTGT	AACTTTAGGT	AACTGGGAT	TATGTTGTAG	TTTAACATTT	TGTAAGTGTG	2220
55	TGCTTATAGT	TTACAAGTGA	GACCCGATAT	GTCATTATGC	ATACTTATAT	TATCTTAAGC	2280
	ATGTGTAATG	CTGGATGTGT	ACAGTACAGT	ACTGAACTTG	TAATTTGAAT	CTAGTATGGT	2340
	GTTCTGTTTT	CAGCTGACTT	GGACAACCTG	ACTGGCTTTG	CACAGGTGTT	CCCTGAGTTG	2400
60	TTTGAGGTT	TCTGTGTGTG	GGGTGGGGTA	TGGGGAGGAG	AACCTTCATG	GTGGCCACC	2460
	TGGCCTGGTT	GTCCAAGCTG	TGCCTCGACA	CATCCTCATC	CCCAGCATGG	GACACCTCAA	2520

GATGAATAAT AATTCACAAA ATTTCTGTGA AATCAAATCC AGTTTAAAGA GGAGCCACTT 2580  
 ATCAAAGAGA TTTTAACAGT AGTAAGAAGG CAAAGAATAA ACATTTGATA TTCAGCAACT 2640  
 5 G 2641

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

10 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 199 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

15 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

20 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe Leu Phe Cys Leu Arg Ile Lys  
 1 5 10 15  
 25 Val Leu Thr Gly Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met Phe Ile  
 20 25 30  
 Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val  
 35 40 45  
 30 Gln Gln Phe Lys Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln Ile Leu Cys Asp  
 50 55 60  
 35 Leu Thr Lys Thr Lys Gly Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Ser Leu  
 65 70 75 80  
 Lys Phe Cys His Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu  
 85 90 95  
 40 Tyr Asn Leu Asp His Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe Cys Asn Leu Ser  
 100 105 110  
 45 Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Lys Val Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu  
 115 120 125  
 His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Phe Trp Leu Pro  
 130 135 140  
 50 Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu  
 145 150 155 160  
 Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro  
 165 170 175  
 55 Asn Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser  
 180 185 190  
 Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu  
 195  
 60

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

25

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
    (A) LÄNGE: 17 Basenpaare  
    (B) ART: Nucleotide  
    (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
5      (D) TOPOLOGIE: linear  
    (ii) ART DES MOLEKUELS: DNA  
    (iii) HYPOTHETISCH: Ja  
    (iv) ANTISENSE: NEIN  
10      (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:3:  
        MGNCTSACNG AYG TNAC              17

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:  
    (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
        (A) LÄNGE: 17 Basenpaare  
20      (B) ART: Nucleotide  
        (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
        (D) TOPOLOGIE: linear  
    (ii) ART DES MOLEKUELS: DNA  
    (iii) HYPOTHETISCH: Ja  
25      (iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:  
30      MGNYTDACNG AYG TNAC              17

35

## **Patentansprüche**

### **1. Ein Polypeptid**

- 5 a) mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen,
- b) das auf aktivierten  $CD4^{+}$ - und  $CD8^{+}$ -T-Lymphozyten, aber nicht auf ruhenden oder aktivierten B-Zellen, Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen oder dendritischen Zellen vorkommt, und
- 10 c) das ein Dimer ist, wobei das Polypeptid ein Molekulargewicht von etwa 55 bis 60 kDa hat, bestimmt in einer nicht reduzierenden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, und wobei die zwei Polypeptidketten des Polypeptids ein Molekulargewicht von etwa 27 kDa und etwa 29 kDa haben, gemessen in einer reduzierenden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.

15

2. Ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen und mit einer Aminosäuresequenz, die mindestens 40% Homologie mit der 199 Aminosäure umfassenden Sequenz in Fig. 15 (SEQ ID NO:2) aufweist, oder ein biologisch aktives Fragment oder ein Analogon davon.

20 3. Das Polypeptid mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen gemäß Anspruch 2 und umfassend die Aminosäuresequenz gemäß Fig. 15 (SEQ ID NO:2), oder ein biologisch aktives Fragment oder ein Analogon davon.

4. Eine DNA-Sequenz, die ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder ein  
25 Fragment hiervon kodiert.

5. DNA-Sequenz kodierend ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen, wobei die Sequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

- a) der DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 (Fig. 16) und ihren komplementären Strang
- 30 b) DNA-Sequenz, hybridisierend mit den Sequenzen in (a) und
- c) DNA-Sequenzen, die aufgrund der Degeneration des genetischen Codes mit den Sequenzen in (a) und (b) hybridisieren.

6. Ein Plasmid oder ein viraler DNA-Vektor, enthaltend eine DNA-Sequenz nach

Anspruch 4 oder 5.

7. Eine prokaryotische oder eukaryotische Wirtszelle, stabil transformiert oder transfiziert mit einem Plasmid oder DNA-Vektor nach Anspruch 6.

5

8. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1-3, umfassend das Kultivieren der Wirtszelle nach Anspruch 7 zur Expression des Polypeptids in der Wirtszelle.

10 9. Ein Antikörper, der das Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 1-3 bindet.

10. Ein Antikörper gemäß Anspruch 9, der ein monoklonaler Antikörper ist.

11. Monoklonaler Antikörper, der das Polypeptid nach einem der Ansprüche 1-3  
15 spezifisch erkennt, dadurch gekennzeichnet, daß B-Zellen von Mäusen, die mit PMA und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophore Ionomycin aktivierten humanen T-Lymphozyten immunisiert werden, mit einer Myelomzelllinie zu einem Antikörper-sezernierenden Hybridom fusioniert werden und die monoklonalen Antikörper in der Durchflußzytometrie auf 2-Signal-Molekül-aktivierte gegen ruhende T-Zellen gereinigt werden.

20 12. Hybridomzelle, die den monoklonalen Antikörper nach Anspruch 10 oder 11 erzeugt.

13. Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität des Polypeptids nach einem der Ansprüche 1-3 hemmen, als Arzneimittel.

25 14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei die Substanzen einen monoklonalen Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten umfassen.

15. Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität des Polypeptids nach einem der Ansprüche 1-3 hemmen, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von  
30 Autoimmunkrankheiten, zur Verhinderung der Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen und zur Behandlung einer Dysregulation des Immunsystems.

16. Verwendung des Polypeptids nach einem der Ansprüche 1-3 als Arzneimittel.

17. Verwendung des Polypeptids nach einem der Ansprüche 1-3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Krebserkrankungen, Aids, Asthmaerkrankungen oder chronischen viralen Erkrankungen wie HCV- oder HBV-Infektionen.
- 5 18. Verwendung von Zellen, enthaltend das Polypeptid nach einem der Ansprüche 1-3, als Arzneimittel.
19. Verwendung von Zellen nach Anspruch 18 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Krebserkrankungen, Aids, Asthmaerkrankungen oder chronischen viralen
- 10 Erkrankungen wie HCV- oder HBV-Infektionen.
20. Verwendung von Substanzen, die das Polypeptid nach einem der Ansprüche 1-3 spezifisch erkennen, zur Diagnose von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist.
- 15 21. Verwendung nach Anspruch 20, wobei die Substanzen Nukleinsäure-(RNA, DNA)-Moleküle umfassen.
22. Verwendung nach Anspruch 21, wobei zur Diagnose eine Hybridisierungs- oder
- 20 Nukleinsäureamplifikationstechnik (z.B. PCR) verwendet wird.
23. Verwendung nach Anspruch 20, wobei die Substanzen einen monoklonalen Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten umfassen.
- 25 24. Verwendung nach Anspruch 20 oder 21, wobei zur Diagnose ein ELISA-Nachweis, Durchflußzytometrie, Western Blot, Radioimmunassay, Nephelometrie oder eine histochemische Anfärbung verwendet wird.
- 25 25. Verwendung von Substanzen, die den Signaltransduktionsweg des Polypeptids nach einem der Ansprüche 1-3 in die T-Zelle positiv oder negativ beeinflussen (modulieren) als
- 30 Arzneimittel.
26. Verwendung von Substanzen, die die Heraufregulation des Polypeptids nach einem der Ansprüche 1-3 an die T-Zelloberfläche verhindern als Arzneimittel.

1/17

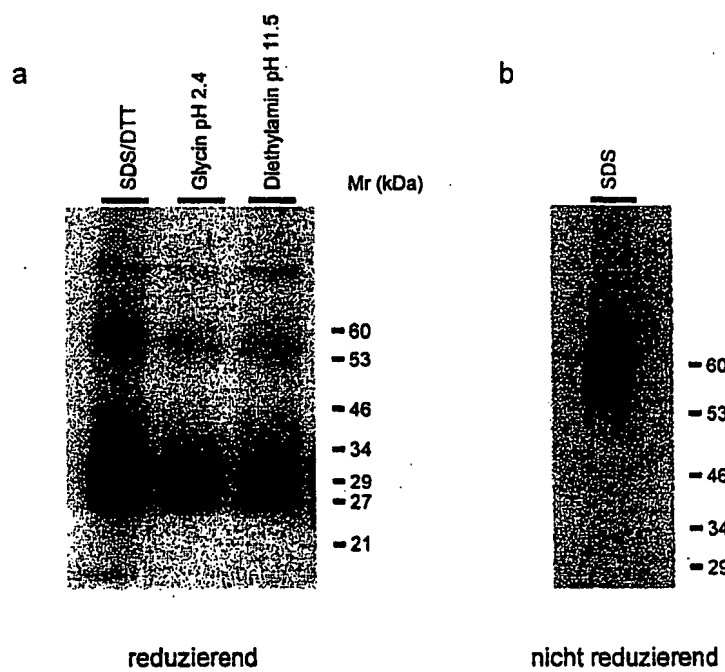


FIG. 1

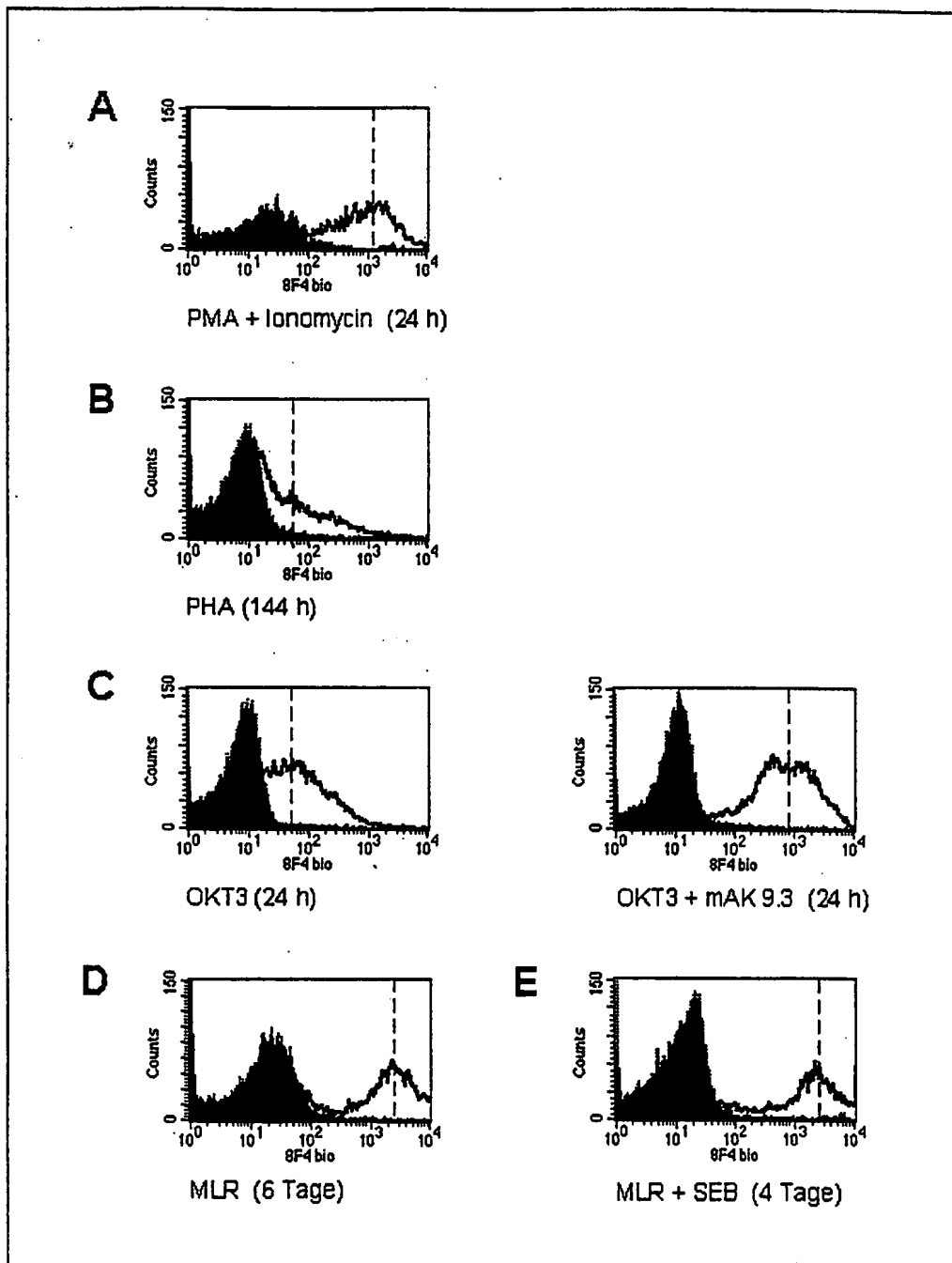


FIG. 2a



3 / 17

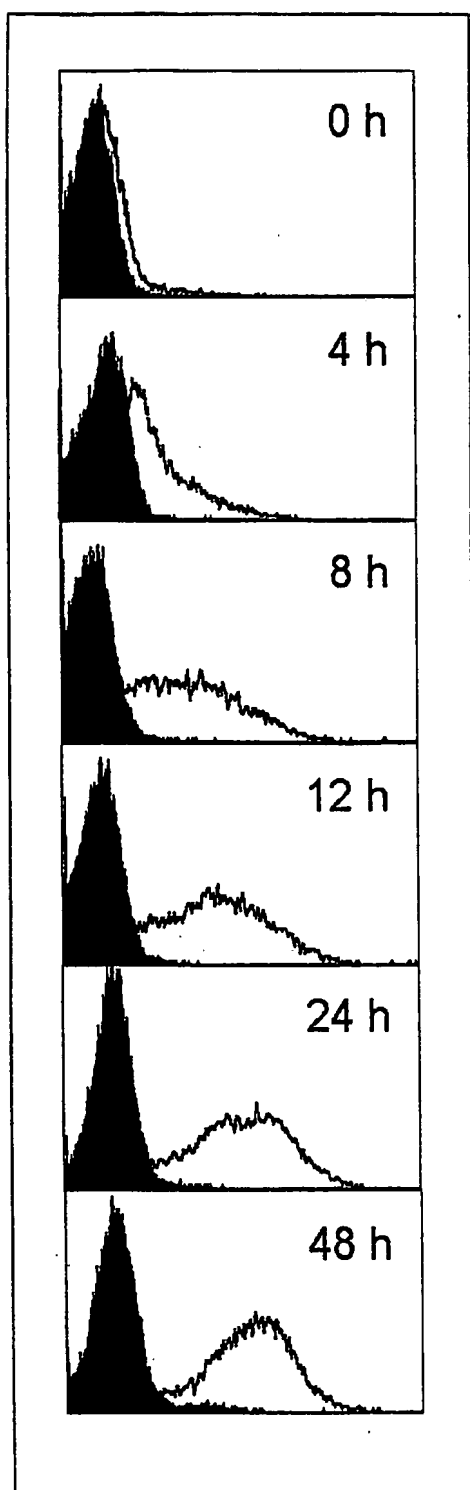


FIG. 2b

4 / 17

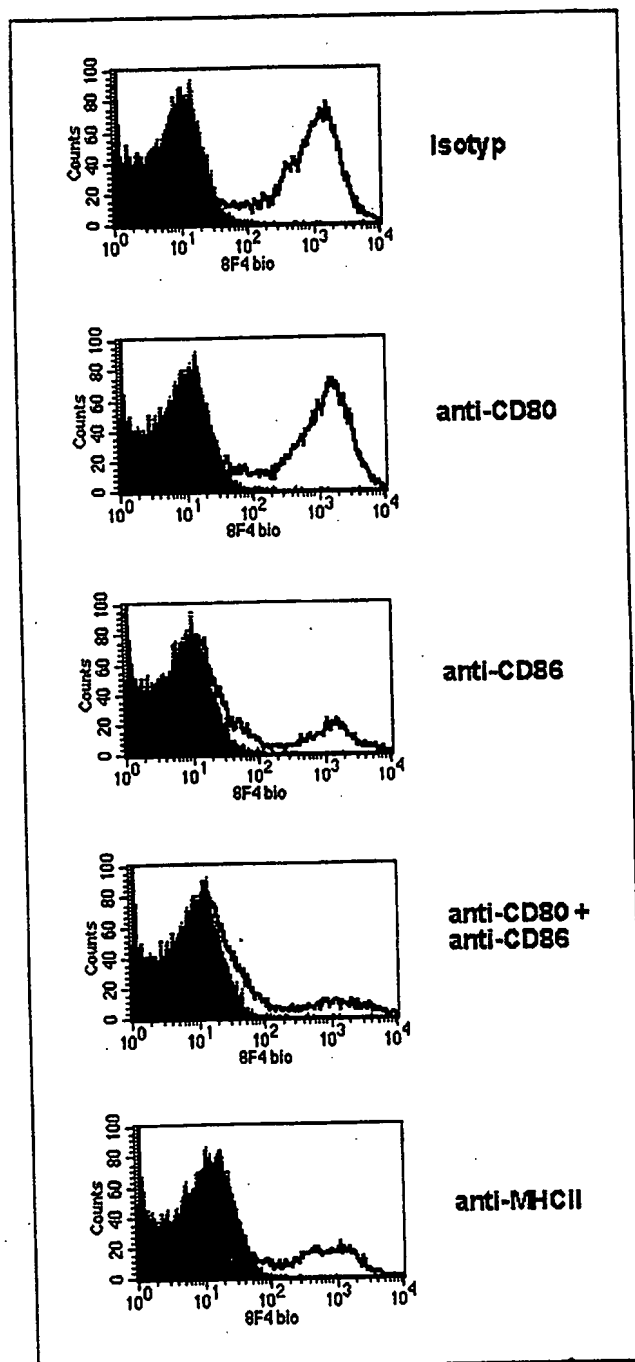
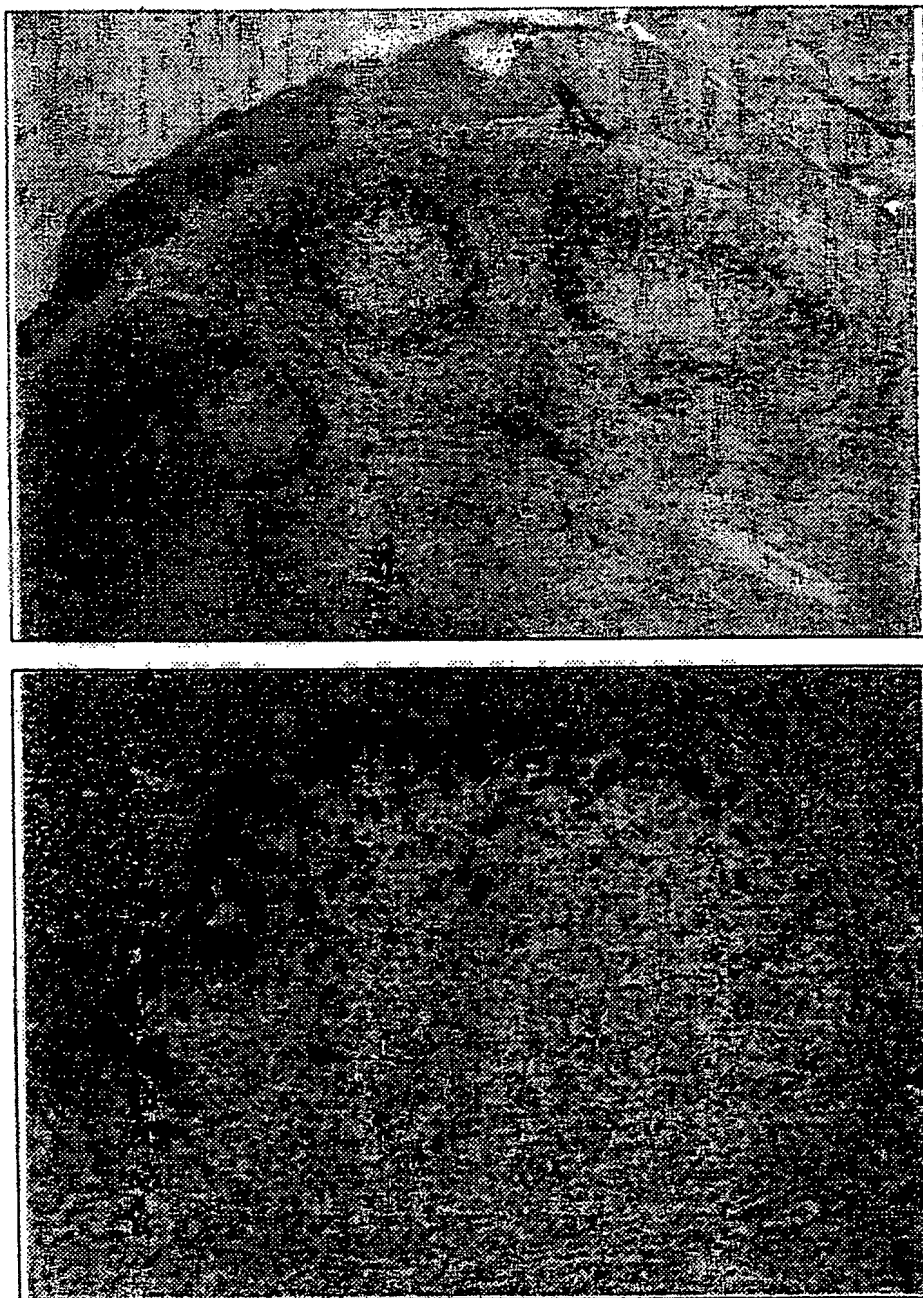


FIG. 3



**FIG. 4**

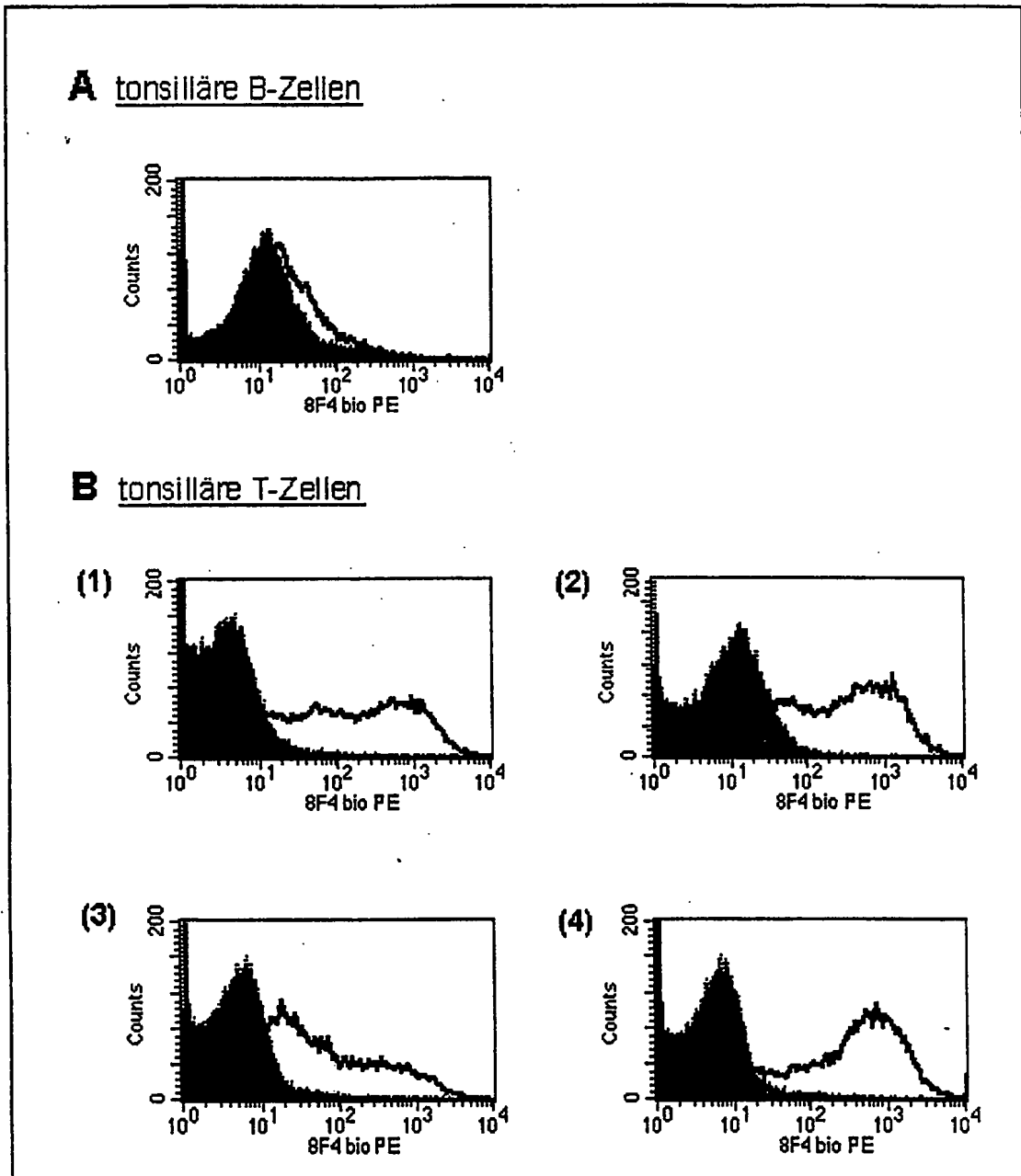


FIG. 5

7/17

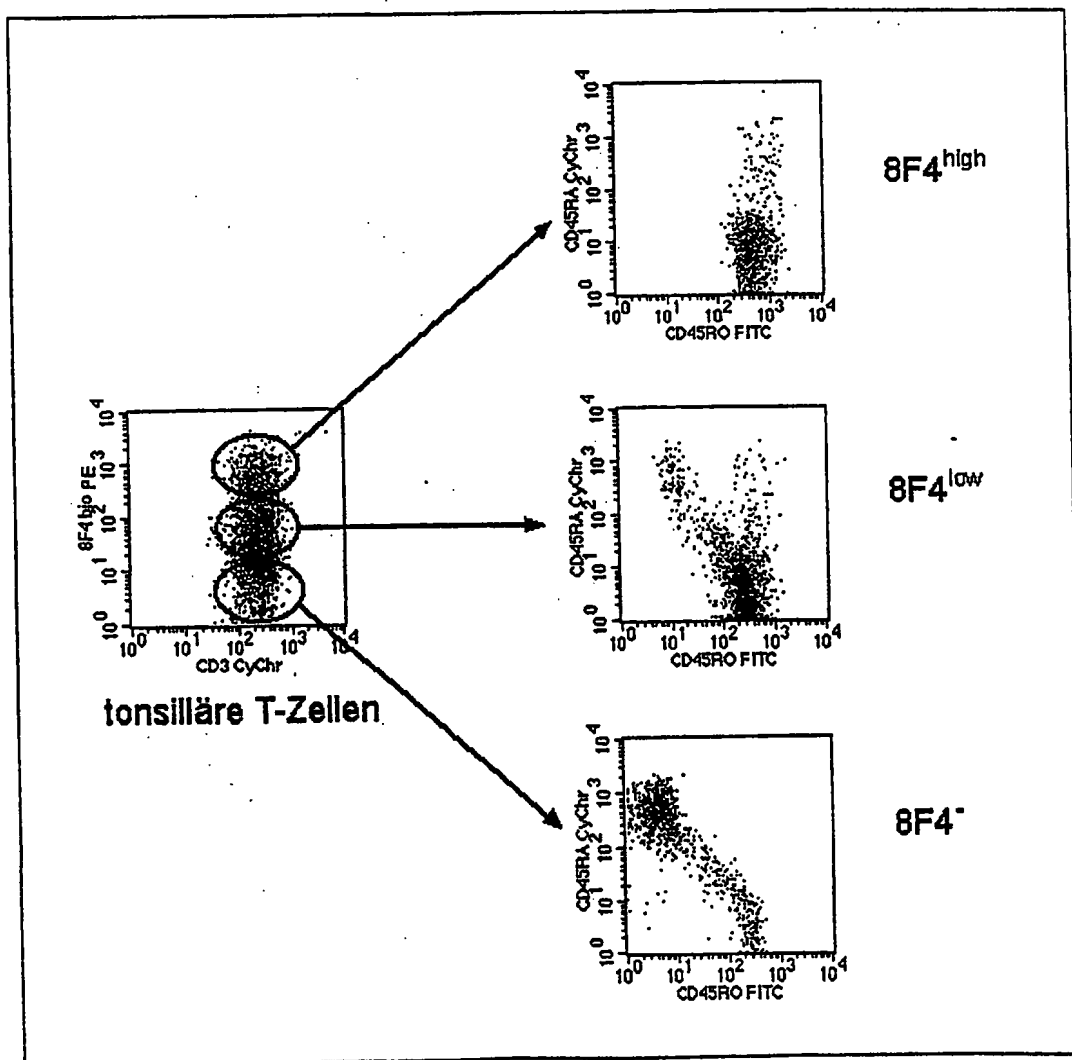
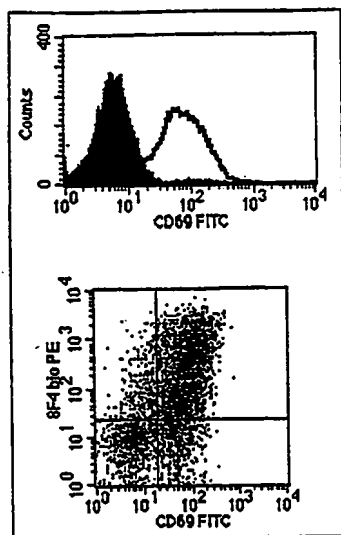


FIG. 6

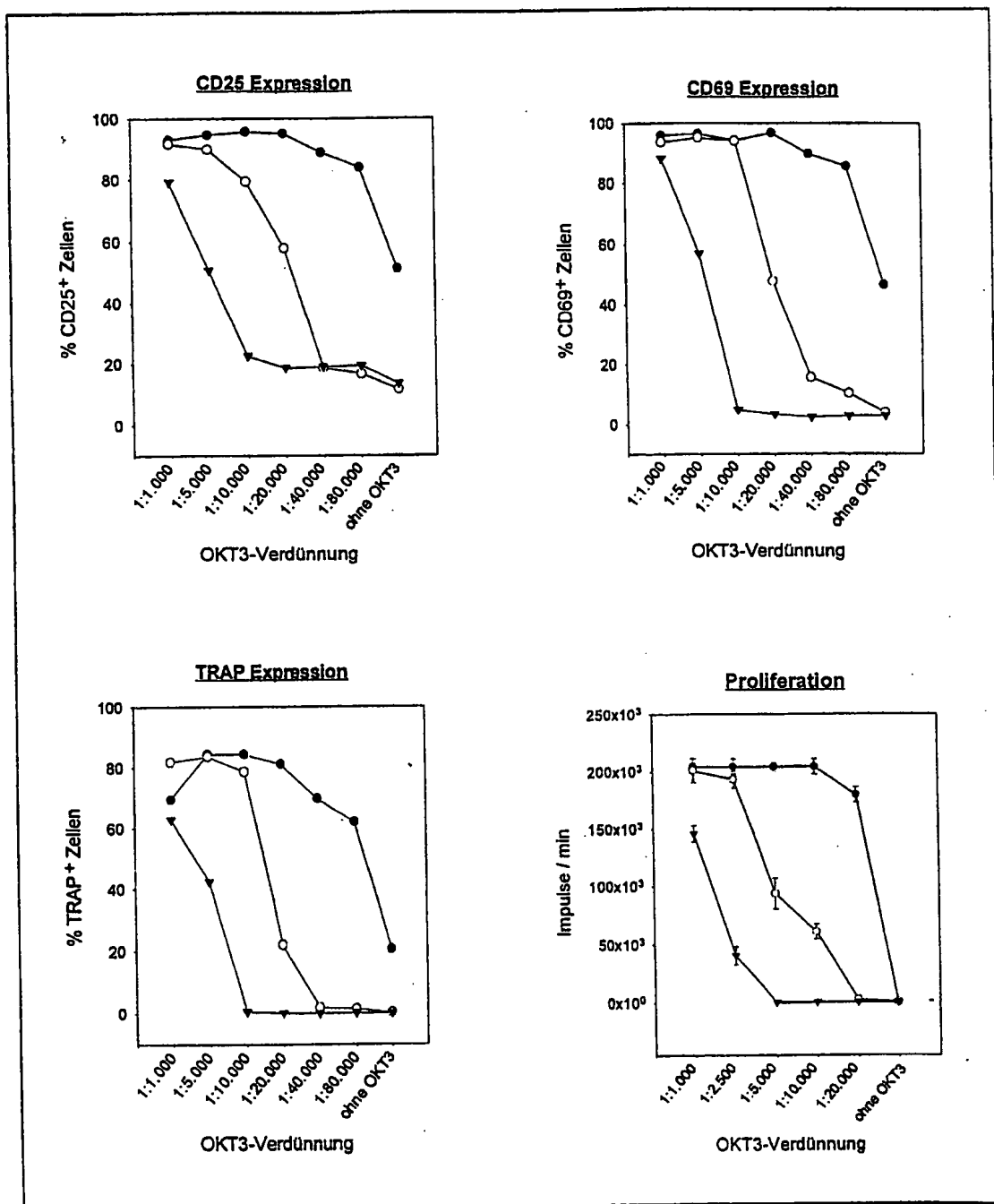


FIG. 7

9/17

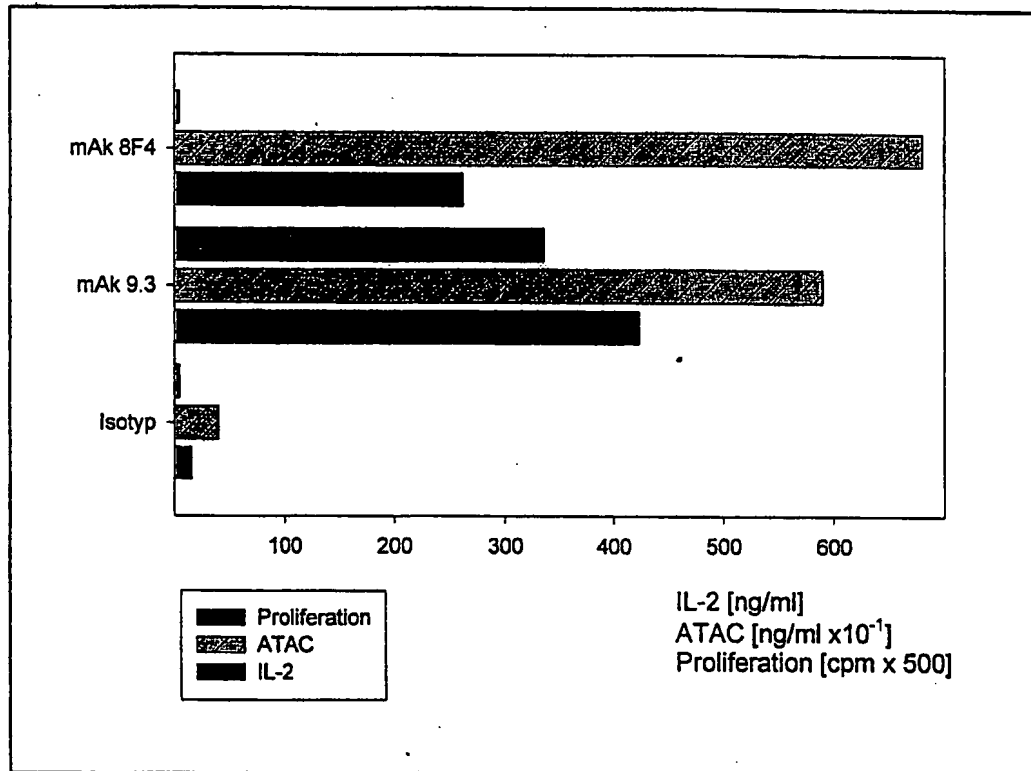


FIG. 8

10/17

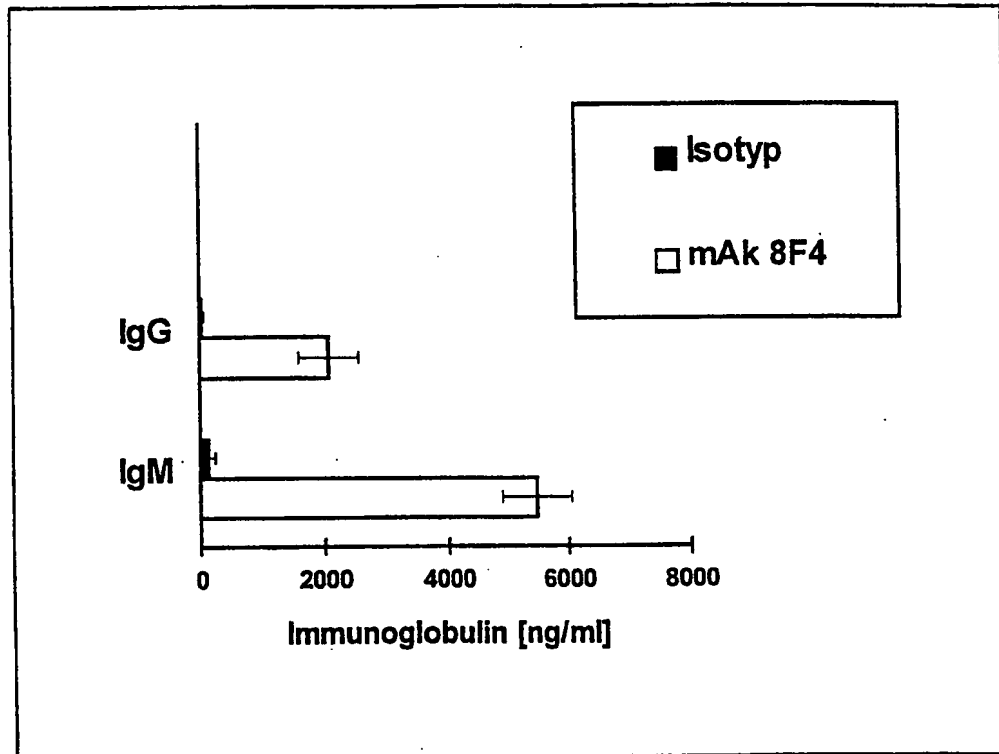


FIG. 9



11/17

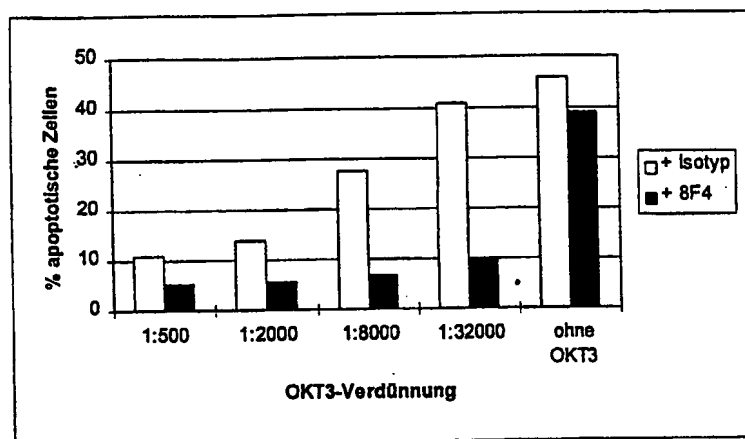


FIG. 10

12/17

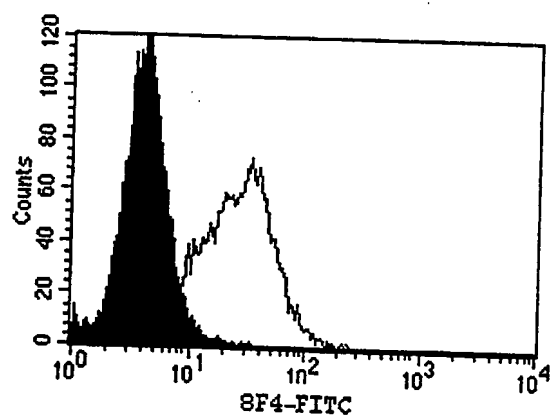


FIG. 11

13/17

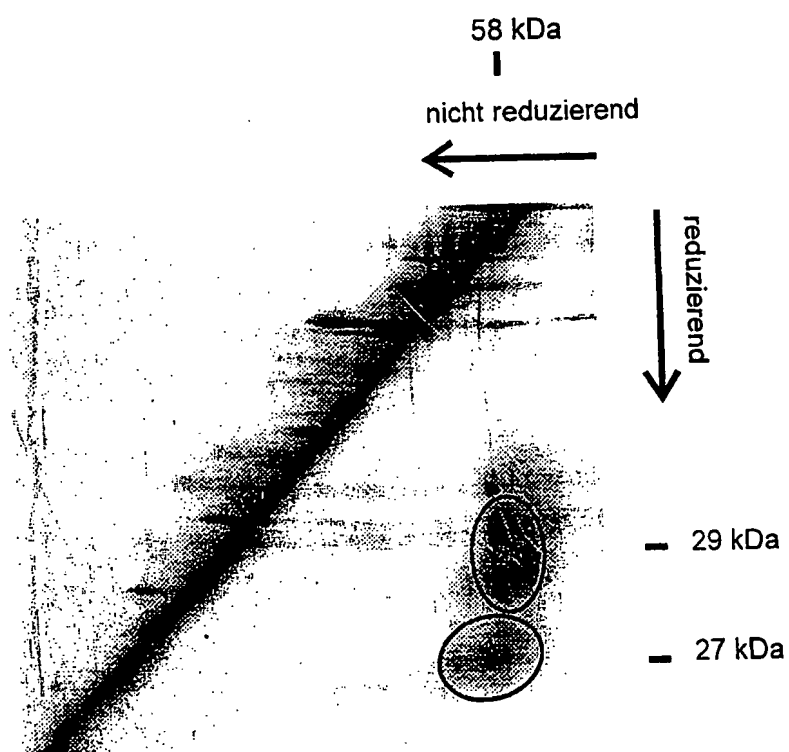
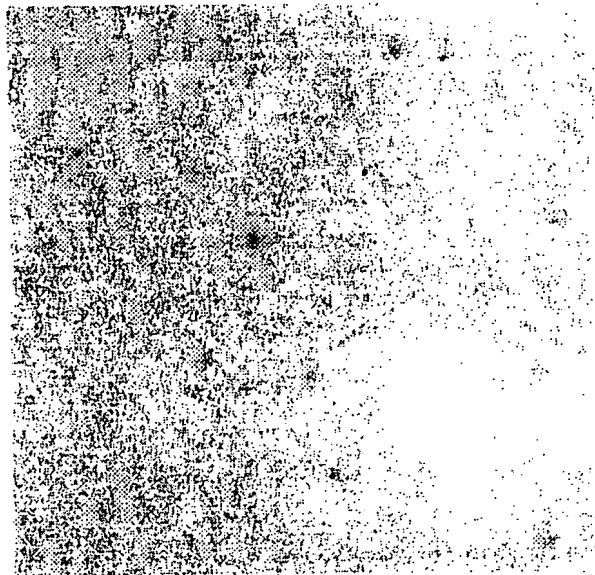


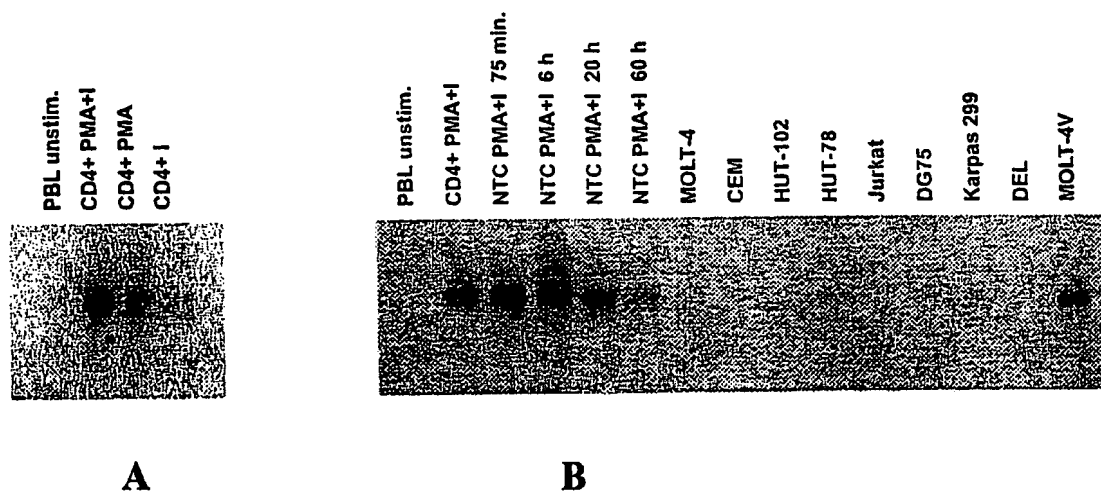
FIG. 12

14/17



**FIG. 13**

15/17



**FIG. 14**

16/17

MKSGLWYFFLFCLRIKVL TGEINGSANYEMFIFHNGGVQILCKYPDIVQQFKMQLL  
KGGQILCDLTKTKGSGNTVSIKSLKFCHSQLSNNSVSFFLYNLDHSHANYYFCNLSI  
FDPPPFKVTLTGGYLHIYESQLCCQLKFWLPIGCAAFVVVCILGCILICWLTKKKYS  
SSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL

**FIG. 15**

CGAGAGCCTGAATTCACCTGTCAGCTTTGAACACTGAACGCGAGGACTGTAACTGTTTCT  
GGCAAACATGAAGTCAGGCCTCTGGTATTTCTTTCTCTCTGCTTGCGCATTAAAGTTTT  
AACAGGAGAAATCAATGGTCTGCCAATTATGAGATGTTTATATTTACAAACGGAGGTGT  
ACAAATTTTATGCAAATATCCTGACATTGTCCAGCAATTTAAAATGCAGTTGCTGAAAGG  
GGGGCAAATACTCTGCGATCTCACTAAGACAAAAGGAAGTGGAAACACAGTGTCCATTAA  
GAGTCTGAAATTCCTGCCATTCTCAGTTATCCAACAACAGTGTCTCTTTTTTTCTATACAA  
CTTGGACCATTCCTCATGCCAACTATTACTTCTGCAACCTATCAATTTTTGATCCTCCTCC  
TTTTAAAGTAACTCTTACAGGAGGATATTTGCATATTTATGAATCACAACTTTGTTGCCA  
GCTGAAGTTCTGGTTACCCATAGGATGTGCAGCCTTTGTTGTAGTCTGCATTTTGGGATG  
CATACTTATTTGTTGGCTTACAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGG  
TGAATACATGTTTCATGAGAGCAGTGAACACAGCCAAAAATCTAGACTCACAGATGTGAC  
CCTATAATATGGAACCTCTGGCACCAGGCATGAAGCACGTTGGCCAGTTTTCTCAACTT  
GAAGTGCAAGATTCTCTTATTTCCGGGACCACGGAGAGTCTGACTTAACTACATACATCT  
TCTGCTGGTGTCTTGTCAATCTGGAAGAATGACTGTATCAGTCAATGGGGATTTTAAACA  
GACTGCCCTTGGTACTGCCGAGTCTCTCAAACAAACACCCTCTTGCAACCAGCTTTGGA  
GAAAGCCCAGCTCCTGTGTGCTCACTGGGAGTGGAAATCCCTGTCTCCACATCTGCTCCTA  
GCAGTGCATCAGCGAGTAAACAAACACATTTACAAGAAAAATGTTTTAAAGATGCCAGG  
GGTACTGAATCTGCAAAGCAAATGAGCAGCCAAAGGACCAGCATCTGTCCGCATTTCACTA  
TCATACTACCTCTTCTTTCTGTAGGGATGAGAATTCCTCTTTTAAATCAGTCAAGGGAGAT  
GCTTCAAAGCTGGAGCTATTTTATTTCTGAGATGTTGATGTGAACGTGTACATTAGTACAT  
ACTCAGTACTCTCCTTCAATTGCTGAACCCAGTTGACCAATTTTACCAAGACTTTAGATG  
CTTTCTTGTGCCCTCAATTTTCTTTTTTAAAAATACTTCTACATGACTGCTTGACAGCCCA  
ACAGCCACTCTCAATAGAGAGCTATGTCTTACATTCTTTCCTCTGCTGCTCAATAGTTTT  
ATATATCTATGCATACATATATACACACATATGTATATAAAATTCATAATGAATATATTT  
GCCTATATTCTCCCTACAAGAATATTTTGTCTCCAGAAAGACATGTTCTTTTCTCAAATT  
CAGTTAAATGGTTTACTTTGTTCAAGTTAGTGGTAGGAAACATTGCCCGGAATTGAAAG  
CAAATTTATTTTATTATCCTATTTTCTACCATTATCTATGTTTTCATGGTGTATTAATT  
ACAAGTTTAGTTCTTTTGTAGATCATATTAATTTGCAAACAAAATCATCTTTAATGGG  
CCAGCATTCTCATGGGGTAGAGCAGAATATTCATTTAGCCTGAAAGCTGCAGTTACTATA  
GGTTGCTGTCAGACTATACCCATGGTGCCTCTGGGCTTGACAGGTCAAATGGTCCCAT  
CAGCCTGGAGCAGCCCTCCAGACCTGGGTGGAATTCAGGGTTGAGAGACTCCCCTGAGC  
CAGAGGCCACTAGGTATTCTTGCTCCCAGAGGCTGAAGTCACCTGGGAATCACAGTGGT  
CTACCTGCATTACATAATTCAGGATCTGTGAAGAGCACATATGTGTGAGGGCACAAATTC  
CTCTCATAAAAACACACAGCCTGGAAATTGGCCCTGGCCCTTCAAGATAGCCTTCTTTA  
GAATATGATTTGGCTAGAAAGATTCTTAAATATGTGGAATATGATTATTCTTAGCTGGAA  
TATTTTCTCTACTTCTGTCTGCATGCCCAAGGCTTCTGAAGCAGCCAATGTGATGCAA  
CAACATTTGTAACTTTAGGTAACTGGGATTATGTTGTAGTTTAAACATTTTGTAACTGTG  
TGCTTATAGTTTACAAGTGAGACCCGATATGTCATTATGCATACTTATATTATCTTAAGC  
ATGTGTAATGCTGGATGTGTACAGTACAGTACTGAACTTGTAATTTGAATCTAGTATGGT  
GTTCTGTTTTCTAGCTGACTTGACAAACCTGACTGGCTTTGCACAGGTGTTCCCTGAGTTG  
TTTGCAGGTTTTCTGTGTGTGGGGTGGGGTATGGGGAGGAGAACCTTCATGGTGGCCACC  
TGGCCTGGTTGTCCAAGCTGTGCCTCGACACATCCTCATCCCAGCATGGGACACCTCAA  
GATGAATAATAATTCACAAAATTTCTGTGAAATCAAATCCAGTTTTAAGAGGAGCCACTT  
ATCAAAGAGATTTTAAACAGTAGTAAGAAGGCAAAGAATAAACATTTGATATTCAGCAACT  
G

FIG. 16

**WO9838216**

Publication Title:

**CELL SURFACE MOLECULE MEDIATING CELL ADHESION AND SIGNAL TRANSMISSION**

Abstract:

Abstract of WO9838216

A novel cell surface molecule recognized by a monoclonal antibody, which is expressed specifically in thymocytes, lymphocytes activated by ConA-stimulation and peripheral blood lymphocytes and has been found out from among monoclonal antibodies against cell surface molecules in lymphocytic cells having important roles in autoimmune diseases and allergic diseases, is isolated and identified. Further, functions of this molecule are analyzed. Moreover, it is found that an antibody against this molecule significantly ameliorates conditions of autoimmune diseases and allergic diseases. Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

-----  
Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

*This Patent PDF Generated by Patent Fetcher(TM), a service of Stroke of Color, Inc.*





## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>C07K 14/705, 16/28, 9/00, C12N 5/10, 15/12, C12P 21/08, A01K 67/027, A61K 38/17, 39/395</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO98/38216</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 1998年9月3日 (03.09.98)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP98/00837 <b>(22) 国際出願日</b> 1998年2月27日 (27.02.98) <b>(30) 優先権データ</b> 特願平9/62290 1997年2月27日 (27.02.97) JP 特願平10/62217 1998年2月26日 (26.02.98) JP <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 日本たばこ産業株式会社(JAPAN TOBACCO INC.)[JP/JP] 〒105-8422 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号 Tokyo, (JP) <b>(72) 発明者 ; および</b> <b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b> 玉谷卓也(TAMATANI, Takuya)[JP/JP] 手塚克成(TEZUKA, Katsunari)[JP/JP] 〒236-0004 神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-2 日本たばこ産業株式会社 医薬探索研究所内 Kanagawa, (JP) <b>(74) 代理人</b> 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)		<b>(81) 指定国</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  添付公開書類 国際調査報告書
<b>(54)Title: CELL SURFACE MOLECULE MEDIATING CELL ADHESION AND SIGNAL TRANSMISSION</b> <b>(54)発明の名称</b> 細胞間接着及びシグナル伝達を媒介する細胞表面分子  <b>(57) Abstract</b> A novel cell surface molecule recognized by a monoclonal antibody, which is expressed specifically in thymocytes, lymphocytes activated by ConA-stimulation and peripheral blood lymphocytes and has been found out from among monoclonal antibodies against cell surface molecules in lymphocytic cells having important roles in autoimmune diseases and allergic diseases, is isolated and identified. Further, functions of this molecule are analyzed. Moreover, it is found that an antibody against this molecule significantly ameliorates conditions of autoimmune diseases and allergic diseases.		

(57) 要約

自己免疫疾患やアレルギー疾患などにおいて重要な働きをするリンパ球系細胞の細胞表面分子に対するモノクローナル抗体の中から、胸腺細胞、ConA刺激活性化リンパ球及び末梢血リンパ球に特異的に発現し、且つ該細胞の細胞間接着を誘導するモノクローナル抗体を見出し、該モノクローナル抗体が認識する新規細胞表面分子を単離、同定するとともに、該分子の機能を解析した。さらに、該分子に対する抗体が、自己免疫疾患やアレルギー疾患の病状を有意に抑制することを見出した。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード（参考情報）

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	FR	フランス	LV	ラトヴィア	SD	スウーダン
AT	オーストリア	GB	英国	MC	モナコ	TG	トーゴ
AZ	アゼルバイジャン	GE	グルジア	MD	モルドバ	TM	タジキスタン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GH	ガナ	MG	マダガスカル	TR	トルコ
BB	バルバドス	GN	ギニア	MK	マケドニア共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BE	ベルギー	GW	ギニア・ビサウ	ML	マリ	UG	ウガンダ
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MN	モンゴル	US	米国
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	MR	モロッコ	UZ	ウズベキスタン
BR	ブラジル	ID	インドネシア	MW	マラウイ	VN	ヴェトナム
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	YU	ユーゴスラヴィア
CA	カナダ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	ZW	ジンバブエ
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	NN	ノルウェー		
CG	コンゴ	IS	アイスランド	NO	ノルウェー		
CH	スイス	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CI	コートジボワール	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CM	カメルーン	KR	韓国	PT	ポルトガル		
CN	中国	KG	キルギス	PR	プエルトリコ		
CU	キューバ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
CY	キプロス	KZ	カザフスタン	RU	ロシア		
CZ	チェコ	LC	セント・ルシア	SE	スウェーデン		
DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		
DK	デンマーク	LK	スリランカ	SI	スロベニア		
EE	エストニア	LS	レソト	SK	スロバキア		
				SL	シエラ・レオネ		

## 明細書

### 細胞間接着及びシグナル伝達を媒介する細胞表面分子

#### 技術分野

本発明は、哺乳動物の新規な細胞表面分子、該分子を構成するポリペプチド及びその断片、該ポリペプチド断片と免疫グロブリン断片からなる融合ポリペプチド、該ポリペプチド及び該断片をコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクター、該ベクターが導入された形質転換体、該ポリペプチド若しくは該ポリペプチドにより構成される細胞表面分子反応性を有する抗体、該抗体を産生するハイブリドーマ、該ポリペプチド断片若しくは該融合ポリペプチドを含んでなる医薬組成物、該抗体を含有してなる医薬組成物、トランスジェニックマウス、並びにノックアウトマウスに関する。

#### 背景技術

哺乳動物の生体は、体内に侵入した病原微生物（ウイルス、細菌、寄生虫など）や外来異物など（以下、併せて「抗原」と呼ぶ。）を排除しようとする免疫応答システムを有する。その1つは、自然免疫応答システムと呼ばれ、他の1つは獲得免疫応答システムと呼ばれるものである。前者は、食細胞（多形核白血球、単球、マクロファージなど）による貪食、ナチュラルキラー（NK）細胞による攻撃、及び補体による抗原のオプソニン化などのような非特異的な認識による排除機構である。後者の獲得免疫応答システムは、該抗原に対する特異性を獲得（活性化）したリンパ球（主にT細胞、B細胞）による排除機構である。抗原特異性を獲得したB細胞は、該抗原に特異的な抗体を産生することにより細胞外に存在する該抗原を攻撃する。抗原特異性を獲得（活性化）したT細胞は、ヘルパ

一T細胞と細胞傷害性T細胞 (cytotoxic T cell; cytotoxic lymphocyte; CTL) に分類され、前者はB細胞の分化や抗体の産生を調節するとともに食細胞と協同して該抗原を破壊する。後者は、自らウイルス感染細胞などを攻撃する (実験医学 (別冊)・「Bio Science用語ライブラリー [免疫]」、羊土社、p.14-17、1995)。

このT細胞による抗原特異性の獲得 (活性化) は、T細胞が、マクロファージ、B細胞あるいは樹状細胞などの抗原提示細胞 (antigen-presenting cells: APC) により提示される抗原を認識することにより開始される。抗原提示細胞は、取り込んだ抗原をプロセッシング (加工) し、この加工された抗原を主要組織適合性抗原複合体 (MHC) に結合させて抗原提示する。T細胞は、抗原提示細胞により提示された該加工抗原を、その細胞膜表面に有するT細胞受容体 (TcR) とCD3抗原との複合体 (TcR/CD3複合体) を通じて認識することで細胞の活性化 (特異性の獲得) のための第1のシグナルを受ける。

しかしながら、このTcR/CD3複合体を介した第1シグナルだけでは、T細胞の十分な活性化が起こらないだけでなく、その後に受ける如何なる刺激に対しても反応しなくなる不応答状態 (unresponsiveness) またはクローン麻痺 (clonal anergy) と呼ばれる状態に陥る。T細胞が活性化され抗原特異的なT細胞クローンに分化、増殖するためにはインターロイキン-2 (IL-2) の自己分泌 (オートクリン; autocrine) が必要であるが、クローン麻痺の状態ではIL-2が産生及び細胞分裂が起こらず、T細胞が不活性化された状態となる。即ち、IL-2などのサイトカインの産生を伴うT細胞の活性化には、TcR/CD3複合体を介した第1シグナルに引き続く第2のシグナルを必要とする。この第2のシグナルはコスティミュレトリシグナル (副刺激シグナル; costimulatory signal) と呼ばれる。

T細胞は、T細胞表面上のTcR/CD3複合体とは別の分子を介して抗原提示細胞上のMHCとは別の分子と相互作用 (細胞間接着) することによりこの第2のシグナルを受けとり細胞内に伝達する。この第2のシグナルにより細胞のアナジー (クロ

ン麻痺)が回避されるとともに細胞が活性化される。

抗原提示細胞とT細胞等のリンパ球の間の第2のシグナルの伝達のメカニズムについては未だ詳細に解明されていない部分はあるものの、これまでの研究から、この第2のシグナル伝達には、主にT細胞及び胸腺細胞で発現する細胞表面分子であるCD28(別名:Tp44、T44、又は9.3抗原)と抗原提示細胞(マクロファージ、単球、樹状細胞など)で発現する細胞表面分子であるCD80(別名:B7-1、B7、BB1、またはB7/BB1)及び同じく抗原提示細胞状の細胞表面分子であるCD86(別名:B7-2またはB70)との間の相互作用(即ち、それらの分子間の結合を介した細胞間接着)が極めて重要であることが明らかにされている。さらにこの第2のシグナルによるT細胞の活性化の制御には、該第2のシグナルに依存してその発現が増強されると考えられているCTLA-4(Cytolytic T lymphocyte associated antigen 4)と該CD80(B7-1)及びCD86(B7-2)との間の相互作用(即ち、それらの分子間の結合を介した細胞間接着)も重要な役割を担っていることが実験的に明らかにされてきている。即ち、この第2のシグナルの伝達によるT細胞の活性化の制御には、少なくともCD28とCD80/CD86との間の相互作用、該相互作用に依存すると考えられるCTLA-4の発現の増強、並びにCTLA-4とCD80/CD86との間の相互作用が包含されることが明らかにされてきている。

CD28は、このT細胞の活性化とアナジの回避に必要な第2のシグナル(コスティミュレイトリー・シグナル)を伝達するコスティミュレーター分子であることが明らかにされている。この分子が抗原提示細胞上のコスティミュレーター分子であるCD80(B7-1)及びCD86(B7-2)と結合すること(換言すれば、それらの分子間の結合を介した細胞間接着)により伝達される第2のシグナルは、Th1型サイトカインのmRNAを安定化させ、その結果T細胞からのIL-2、IFN $\gamma$ 及びTNF $\alpha$ などのTh1型サイトカインを大量の産生を促す。一方、CTLA-4は、TcR/CD3を通じて入る第1シグナルにより発現が誘導されるとともに、CD28とCD80との結合により入る該第2のシグナルによってもその発現が増強されることが知られている。CTLA-4

は、それらのシグナルを受けて、CD28より入る第2のシグナルによるT細胞の活性化とは反対にT細胞機能に対して抑制的に働くことが明らかになってきている。

ヒトのCD28及びCTLA-4は、各々44kD及び41乃至43kDの分子量を有するI型糖蛋白質である。ともに免疫グロブリン様ドメイン1個を有し、免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、細胞間接着分子としての機能と細胞内へのシグナル伝達分子としての両方の機能を併せ持った分子である。

ヒトCD28はジスルフィド結合によりホモ二量体を形成し、一方、CTLA-4は単量体で存在することが示されている。CD28及びCTLA-4の遺伝子の染色体上に位置は、ヒトにおいてはいずれも「2q33」、またマウスにおいては「1C」であり、いずれも4つのエクソンからなる。ヒトのCD28及びCTLA-4は、リーダー配列を含め各々220及び223個のアミノ酸から構成され、両者のアミノ酸相同性は20乃至30%程度である。

CD28及びCTLA-4のリガンドは、ヒト及びマウスにおいてCD80 (B7-1) 及びCD86 (B7-2) であることが解明されている。CTLA-4は、いずれのリガンドに対してもCD28より親和性が高く、その差は約20倍である。CD28及びCTLA-4のCD80 (B7-1) への結合には、動物種を超えて保存されているアミノ酸配列構造である「MYP PPY (Met-Tyr-Pro-Pro-Pro-Tyr)」が重要であることが明らかにされている。また、CD28が刺激を受けると、その細胞内の部分配列「YMN (Tyr-Met-Asn-Met)」内のリン酸化されたチロシン残基へPI3キナーゼ (phosphoinositide 3 kinase, PI3K) が会合することが示され、CD28はこの「YxxM」構造を介して細胞内シグナル伝達において重要な働きをしていることが示されてきている。また、CTLA4の細胞内領域にも「YxxM」で表わされる配列、即ち「YVKM (Tyr-Val-Lys-Met)」を有しており、刺激を受けた後、この配列にSYNが会合することが示されている。

CD28は、胸腺細胞及び末梢血T細胞に局限して発現し、一方CTLA-4は活性化T細胞に特異的に発現することがわかってきている (細胞工学・別冊「接着分子ハ

ンドブック」、秀潤社発行、第93-102頁、1994年； 同誌、第120-136頁； 実験医学・別冊「BIO SCIENCE 用語ライブラリー・免疫」、羊土社発行、第94-98頁、1995年； 実験医学・別冊「BIO SCIENCE 用語ライブラリー・細胞内シグナル伝達」、羊土社発行、第58-59頁、1997年； 日本臨床、第55巻、第6号、第215-220頁、1997年）。

このようにしてT細胞機能の制御（T細胞の活性化及び機能抑制）におけるコストимуレーター分子（CD28、CD80（B7-1）及びCD86（B7-2）など）並びに連動するCTLA-4などの複数の分子の間の相互作用（換言すれば、それらの分子間の結合を介した細胞間接着）の重要性が提唱されるようになり、それらの分子と疾患との関係の解明、並びにそれらの分子の機能を制御することによる疾患の治療の試みが注目されるようになってきている。

前述のように、生体は、生体（自己）にとって異物である抗原に対しては獲得免疫応答システムを作動させるが、自己の生体成分（自己抗原）に対しては免疫応答を示さない免疫寛容を有している。しかしながら、何らかの原因で免疫寛容の破綻が起こると、自己抗原に対する免疫応答が起こり前述と同様のメカニズムにより自己抗原反応性T細胞が誘導され免疫異常状態に陥り、種々の自己免疫疾患が惹起される。

即ち、生体の免疫システムが正常な状態では、正常組織の無刺激の抗原提示細胞（antigen presenting cell; APC）はコストимуレトリー分子を発現しないため、例え自己抗原に反応する自己抗原反応性T細胞が存在していても、T細胞が不応答状態に陥っているため自己寛容が維持されているが、免疫異常状態においては過剰または継続的なコストимуレトリー分子の発現以上により自己抗原反応性T細胞が活性化され自己免疫疾患が惹起されるという可能性が提示されている。

このような観点から近年、コストимуレトリーシグナルの伝達、例えば前述のCD28/CTLA-4-CD80/CD86の間のシグナル伝達を調節することにより種々の自己

免疫性疾患の治療の試みが多数なされてきている。

自己免疫性疾患である慢性関節リウマチ、多発性硬化症、自己免疫性甲状腺炎、アレルギー性接触性皮膚炎、慢性炎症性皮膚疾患である扁平苔癬、及び乾癬などではその病巣部の抗原提示細胞ではCD28やCTLA-4のリガンドとしてのコストимуレトリー分子であるCD80が異常発現が確認されていることから、特にCD80の機能を抑制することによる該種々の自己免疫性疾患の治療の試みが多くなされてきている。

CD80の機能をブロックする方法としては、CD80に対する抗体、CD80のリガンドであるCD28の可溶化蛋白、あるいは同じくCD80のリガンドであるCTLA-4の可溶化蛋白を用いる方法が検討されてきている。中でも、CTLA-4のCD80に対する結合親和性がCD28のそれと比べ20倍以上であることに基づく「可溶化CTLA-4」、具体的には「CTLA-4」の細胞外ドメインとヒト免疫グロブリンIgG1のFc領域とからなる融合タンパク（CTLA-4-IgFc）を用いた治療の試みが動物モデル並びに臨床試験において行われている（日本臨床、第55巻、第6号、第215-220頁、1997年）。

自己免疫疾患モデル動物でのCTLA-4-IgFcによる治療効果については下記①乃至⑤のような報告がなされている。

①ヒト全身性エリテマトーデス（SLE）のモデルである(NZB/NZW)F1マウスにおいては、発症前投与で自己抗体産生の抑制及びループス腎炎の発症を抑制し、また発症後の投与においても病態改善が認められた（Science, Vol.125, p.1225-1227, 1994）。

②多発性硬化症（MS）のモデルである実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）においては、免疫直後の短期投与により発病を阻止できた（J. Clin. Invest., Vol. 95, p.2783-2789, 1995）。

③インスリン依存性糖尿病（IDDM）モデルであるNOD（non-obese diabetes）マウスでは、生後2乃至3週齢の雌に2週間投与することにより発病率が著明に低下した（J. Exp. Med., Vol.181, p.1145-1155, 1995）。



④グッドパスチャー（Goodpasture）の腎炎モデルである腎糸球体基底膜免疫によるラット腎炎では、投与により症状の改善が認められた（Eur. J. Immunol., Vol.24, No.6, p.1249-1254, 1994）。

⑤ヒト慢性関節リウマチモデルであるDBA/1マウスを用いたタイプIIコラーゲン誘導関節炎（CIA）では、免疫時の投与により関節炎の発症が抑制され、コラーゲンに対する自己抗体（IgG1及びIgG2）の産生が抑制された（Eur. J. Immunol., Vol.26, p.2320-2328, 1996）。

しかしながら、上記のような治療の試みがなされる一方で、コストイミュレター分子及び関連する分子との間の相互作用（換言すれば、それらの分子間の結合を介した細胞間接着）によるT細胞の活性化のメカニズムの詳細な解明は未だなされておらず、またこのメカニズムには未だ同定されていない他の分子が関与する可能性も残っている。

#### 発明の開示

前述のようなT細胞等のリンパ球の活性化に必須な第2のシグナルの伝達に関与する分子間の結合を介した細胞間接着によるT細胞等のリンパ球の活性化及びリンパ球の機能の制御のメカニズムの解明、並びにそのメカニズムに関与する細胞間接着を媒介する能力とシグナルを伝達する能力を併せ持った既知または未知の分子の同定及びその性状解析は、先に述べたような種々の自己免疫疾患、アレルギー性疾患、及び炎症性疾患等の種々の疾患の治療または予防において有用な医薬品の開発し、提供することを可能とする。

即ち、本発明は、そのような細胞間接着の媒介とシグナル伝達という両面の機能を併せ持った新規な細胞表面分子を同定するとともにその構造的及び生物学的な性状を明らかにすることを課題とする。さらに、本発明は、該新規な分子または該分子に対する抗体等を用いることによる種々の自己免疫疾患や炎症性疾患の治療または予防に有用な医薬品を提供することを課題とする。

そのような有用な分子を同定するために、本発明者らは、自己免疫疾患やアレルギー疾患などにおいてはT細胞等のリンパ球が重要な働きをしていること、並びに抗原提示細胞からの第2のシグナル（コスティミュレイトリーシグナル）のリンパ球細胞内へのシグナル伝達には細胞間接着が必須であることに着目し、リンパ球系の細胞に特異的に発現し、且つ細胞間接着を媒介する機能を有する細胞表面分子の単離及び同定を行うことを考えた。

その方法として、まず、リンパ球系細胞自体を免疫することにより該細胞の表面に発現している種々の細胞表面分子に対するモノクローナル抗体を取得し、得られたモノクローナル抗体を用いて細胞間接着を媒介する機能を有する目的の細胞表面分子を単離、同定する手法を用いた。以下、その方法を具体的に説明する。

本発明者らは、まず、ラットのリンパ球系細胞株を免疫原としてマウスに投与して、種々のモノクローナル抗体の作製した。次いで、得られたモノクローナル抗体を、免疫原として用いたラットリンパ球系細胞に作用させ、該モノクローナル抗体が該細胞に与える影響について検討した。この結果、得られたモノクローナル抗体の内の一つが該ラットリンパ球系細胞を強く凝集させる特性を有することを見出した（このモノクローナル抗体を「JTT.1抗体」と命名した。）。さらに、同様にして、作製したモノクローナル抗体の中に、該「JTT.1抗体」により誘導されるラットリンパ球系細胞の凝集を強く阻害するモノクローナル抗体を見出した（このモノクローナル抗体を「JTT.2抗体」と命名した。）。

「JTT.1抗体」によるラットリンパ球系細胞の凝集が、該細胞に発現している既知の最も代表的な細胞間接着分子であるICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1) やLFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen-1) に対する抗体により阻害されなかったことから、この凝集が細胞間接着媒介作用を有する未知の接着分子を介した細胞間接着による凝集であると考えた。

次に、この2つのモノクローナル抗体により各々認識される細胞表面分子（各々「JTT.1抗原」及び「JTT.2抗原」と命名した。）の同定、単離及び性状解析を

行った。

まず、「JTT-1抗体」及び「JTT-2抗体」を用いた蛍光抗体法に基づくフローサイトメトリーにより、種々の細胞における「JTT.1抗原」及び「JTT.2抗原」の発現パターンの解析を行った。この結果、「JTT.1抗原」及び「JTT.2抗原」がともに、胸腺細胞及び脾臓細胞をマイトジェン (mitogen) であるコンカナバリン A (Concanavalin A; ConA) で刺激して活性化した活性化リンパ芽球細胞 (活性化 T リンパ芽球細胞、活性化 B リンパ芽球細胞など)、特に該活性化リンパ芽球細胞で強く発現が確認される一方で、何らの刺激も加えていない脾臓細胞 (このような細胞は、本発明においては、「静止期リンパ球」と呼ばれる場合もある。) にはほとんど発現が見られないことを見出した。また、「JTT-1抗体」及び「JTT-2抗体」の各々により確認される分子の発現パターンは、ほぼ同一であることを見出した。

次いで、吸着剤に「JTT-1抗体」を吸着させて作製したアフィニティーカラムを用いて、前記のラットリンパ球系細胞から調製した可溶性細胞表面分子の混合物から該「JTT-1抗体」によりトラップされる分子、即ち「JTT-1抗原」を精製した。この精製「JTT-1抗原」の分子量を、「JTT-1抗体」及び「JTT-2抗体」を用いた免疫沈降法及びSDS-PAGEにより分析した。その結果、「JTT-1抗体」及び「JTT-2抗体」の各々により免疫沈降される分子が同一の分子であり、また該分子は、各々異なる糖鎖修飾を有するホモダイマーであることを見出した。具体的には、N型糖鎖の消化処理を行わない場合には、非還元化で約47kDの1分子として、また還元化で約24kDと約28kDの2分子として同定され、N型糖鎖の消化処理を行った場合には、非還元化で約36kDの1分子として、また還元化で約20kDの1分子として同定された。

次いで、該精製「JTT.1抗原」をコーティングしたプレートへのラット胸腺細胞の接着の解析を行った。この結果、胸腺細胞が、「JTT.1抗体」存在下でのみ有意にプレートに接着 (即ち、「JTT.1抗原」に接着) し、その接着は「JTT.2抗体」

の共存下で有意に阻害されることを確認し、「JTT.1抗原」が実際に細胞間接着を媒介する細胞表面分子であることを証明した。

次に、本発明者らは、ラット、ヒト及びマウスの「JTT.1抗原」をコードする遺伝子をクローニングし、及びその構造の解析を行った。

具体的には、まず、「JTT.1抗体」を用いたパニング (panning) 法を利用した発現クローニング法により、ConA刺激したラット脾臓由来リンパ芽球のcDNAライブラリーから、「ラットJTT.1抗原」の全長をコードするcDNAを単離することに成功し、ジデオキシ法によりその塩基配列を決定することにより、全く新規なラットの遺伝子を単離、同定した。さらに得られた「ラットJTT.1抗原」をコードするcDNAをプローブとしたブランクハイブリダイゼーションにより、ConA刺激したヒト末梢血リンパ芽球のcDNAライブラリーから、「ヒトJTT.1抗原」の全長をコードするcDNAを単離することに成功し、ジデオキシ法によりその塩基配列を決定することにより、全く新規なヒトの遺伝子を単離、同定した。同様にして、ConA刺激したマウス脾臓由来リンパ芽球のcDNAライブラリーから、「マウスJTT.1抗原」の全長をコードするcDNAを単離することに成功し、ジデオキシ法によりその塩基配列を決定することにより、全く新規なマウスの遺伝子を単離、同定した。さらに、同様にしてラット胸腺腫細胞株のcDNAライブラリーから、前記の「ラットJTT.1抗原」のオールタナティブスプライシング変異体 (alternative splicing variant) の全長をコードするcDNAを単離することに成功し、ジデオキシ法によりその塩基配列を決定することにより、全く新規な別のラットの遺伝子を単離、同定した。

単離された「ヒトJTT-1抗原」のcDNAによりコードされるアミノ酸配列のハイドロパシープロット解析から「JTT.1抗原」が、シグナル配列、糖鎖修飾部位を有する細胞外領域、膜貫通領域、及び細胞内領域から構成される細胞膜貫通蛋白 (即ち、細胞表面分子) であることを見出した。さらに、既知分子とのホモロジー検索の結果、ラット、ヒト及びマウスのいずれの「JTT.1抗原」も、細胞間接着分子

を含めた既知のいかなる分子とも有意な相同性を有せず、且つ細胞間接着媒介機能を有する全く新規な細胞表面分子であることを見出した。

さらに、「ヒトJTT-1抗原」のアミノ酸配列をもとにモチーフ検索を行った結果、「ヒトJTT-1抗原」は、先に詳細に述べた細胞間接着を介してT細胞の活性化に重要なコストイミュレイトリーシグナル伝達するT細胞等のリンパ球の細胞表面分子である「CD28」並びに該シグナルに連動して活性化T細胞等の活性化リンパ球の機能制御を行うT細胞等のリンパ球の細胞表面分子である「CTLA-4」と下記のような構造的類似性を有していることを見出した。

即ち、①システイン残基を含む20以上のアミノ酸残基が良く保存されている。②リガンド結合領域として必須なプロリン残基の連続する配列「Pro-Pro-Pro (PPP)」が細胞外領域に保存されている。また、③シグナル伝達領域として必須な配列「Tyr-Xaa-Xaa-Met (YxxM) (Xaa及びxは任意のアミノ酸を意味する。）」が細胞内領域に保存されている。

次に、蛍光インサイチュウハイブリダイゼーション (FISH) 法を用いて、「マウスJTT-1抗原」をコードする遺伝子のマウス染色体上での位置を解析したところ、その位置は、マウスの「CD28」及び「CTLA-4」の位置と同じ、「1C3」であることを見出した。

次に、「JTT-1抗原」の機能を制御することによる自己免疫疾患及びアレルギー性疾患の治療の有効性を解析するために、前述の「JTT-2抗体」を実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) 及び糸球体基底膜 (GBM) 腎炎のモデルラットに投与する実験を行った。その結果、いずれの疾患モデル動物においても、病状の有意な抑制が見られることを発見し、「JTT-1抗原」の機能を制御することにより自己免疫疾患やアレルギー性疾患の治療が可能であることを見出した。

さらに、「ヒトJTT-1抗原」に対するモノクローナル抗体が、ヒト末梢血リンパ球を有意に増殖させること、またその増殖は、T細胞の活性化に必須な抗原提示細胞からの第1のシグナルを受け取るT細胞上のTcR/CD3複合体を構成するCD3に

対するモノクローナル抗体を共存させることによりさらに高い増殖が見られることを発見し、「JTT-1抗原」がリンパ球へのシグナル伝達に関与する細胞表面分子であることを見出した。

さらに、「JTT-1抗原」及び／またはそのリガンドの機能を制御することによる自己免疫疾患、アレルギー性疾患または炎症性疾患の治療のための医薬品として有用な、「ヒトJTT-1抗原」の細胞外領域とヒト免疫グロブリンのFc領域からなる融合ポリペプチドを製造することに成功した。

さらに、「JTT-1抗原」の詳細な機能を解析し、自己免疫疾患、アレルギー性疾患及び炎症性疾患の治療のための医薬品を開発するために有用な、他の動物種の「JTT-1抗原」をコードする遺伝子が導入されたトランスジェニックマウス、並びに「マウスJTT-1抗原」をコードする内在性遺伝子が不活性化されたノックアウトマウスを作製することに成功した。

即ち、本発明は、上述のようにして単離、同定された新規な哺乳動物の「JTT-1抗原」に関係するポリペプチド、遺伝子、抗体、ベクター、形質転換体、医薬組成物、トランスジェニックマウス、及びノックアウトマウス等に関する。具体的には、下記（１）乃至（３６）に記載される発明に関する。

（１）下記の特徴を有する細胞表面分子を構成するポリペプチド：

（a）少なくとも胸腺細胞及びマイトジェン（mitogen）で刺激したリンパ芽球細胞で発現する；

（b）該細胞表面分子に反応性を有する抗体は、マイトジェンで刺激したリンパ芽球細胞間の接着を誘導する；

（c）該細胞表面分子に反応性を有する抗体は、CD3に反応性を有する抗体との共存下で末梢血リンパ球の増殖を誘導する；

（d）細胞外領域にPhe-Asp-Pro-Pro-Pheで表わされる部分アミノ酸配列を有する；及び

（e）細胞内領域にTyr-Met-Phe-Metで表わされる部分アミノ酸配列を有する。

(2) 該ポリペプチドが、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列、または配列番号 2 に記載のアミノ酸配列中のアミノ酸において 1 もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加されたアミノ酸配列を有することを特徴とする前記 (1) に記載のポリペプチド。

(3) 該ポリペプチドが、配列番号 1 に記載の塩基配列からなる DNA にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA によりコードされることを特徴とする前記 (1) に記載のポリペプチド。

(4) 該ポリペプチドが、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列と 60% 以上の相同性を有するアミノ酸配列を有することを特徴とする前記 (1) に記載のポリペプチド。

(5) 該細胞表面分子が、ヒト由来の細胞表面分子であることを特徴とする前記 (1) 乃至前記 (4) のいずれかに記載のポリペプチド。

(6) 前記 (1) 乃至前記 (5) のいずれかに記載のポリペプチドをコードする遺伝子。

(7) 該遺伝子が、cDNA であることを特徴とする前記 (6) に記載の遺伝子。

(8) 該 cDNA が、配列番号 1 に記載の塩基配列を有することを特徴とする前記 (7) に記載の遺伝子。

(9) 該 cDNA が、配列番号 3 の塩基番号 26 乃至 625 に記載の塩基配列、配列番号 4 の塩基番号 35 乃至 637 に記載の塩基配列、配列番号 5 の塩基番号 1 乃至 603 に記載の塩基配列、または配列番号 6 の塩基番号 35 乃至 685 に記載の塩基配列のいずれかを含むことを特徴とする前記 (7) に記載の遺伝子。

(10) 前記 (6) 乃至前記 (9) のいずれかに記載の遺伝子を含有するベクター。

(11) 前記 (10) に記載のベクターが導入された形質転換体。

(12) 国際寄託番号 FERM BP-5725 で識別される形質転換体。

(13) 前記(1)乃至前記(5)のいずれかに記載のポリペプチドの細胞外領域からなるポリペプチド断片。

(14) 該ポリペプチドが、配列番号2に記載されるアミノ酸配列を有するヒト由来のポリペプチドであることを特徴とする前記(13)に記載のポリペプチド断片。

(15) 前記(13)または前記(14)に記載のポリペプチド断片をコードする遺伝子。

(16) 前記(1)乃至前記(5)のいずれかに記載のポリペプチドの細胞外領域からなるポリペプチド断片がジスルフィド結合により結合して形成されるホモダイマー分子。

(17) 該ポリペプチドが、配列番号2に記載されるアミノ酸配列を有するヒト由来のポリペプチドであることを特徴とする前記(16)に記載のホモダイマー分子。

(18) 前記(14)に記載のポリペプチド断片若しくは前記(17)に記載のホモダイマー分子のいずれか一方または両方と薬学的に許容されうる担体を含んでなる医薬組成物。

(19) 前記(1)乃至前記(5)のいずれかに記載のポリペプチドの細胞外領域とヒトの免疫グロブリン(Ig)の重鎖の定常領域または定常領域の一部とからなる融合ポリペプチド。

(20) 免疫グロブリンが、IgGであることを特徴とする前記(19)に記載の融合ポリペプチド。

(21) 定常領域の一部が、IgGのヒンジ領域、C2ドメイン及びC3ドメインからなることを特徴とする前記(19)に記載の融合ポリペプチド。

(22) 該ポリペプチドが、配列番号2に記載されるアミノ酸配列を有するヒト由来のポリペプチドであることを特徴とする前記(19)乃至前記(21)のいずれかに記載の融合ポリペプチド。



(23) 前記(19)乃至前記(22)のいずれかに記載の融合ポリペプチドがジスルフィド結合により結合して形成されるホモダイマー分子。

(24) 前記(22)に記載の融合ポリペプチドがジスルフィド結合により結合して形成されるホモダイマー分子。

(25) 前記(22)に記載の融合ポリペプチド若しくは前記(24)に記載のホモダイマー分子のいずれか一方または両方と薬学的に許容されうる担体を含んでなる医薬組成物。

(26) 該医薬組成物が、自己免疫疾患またはアレルギー性疾患の治療または該疾患症状の抑制に用いられることを特徴とする前記(25)に記載の医薬組成物。

(27) 前記(1)乃至前記(5)のいずれかに記載のポリペプチド、前記(13)若しくは前記(14)に記載のポリペプチド断片または該ポリペプチドにより構成される細胞表面分子に反応性を有する抗体またはその一部。

(28) 該抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする前記(27)に記載の抗体またはその一部。

(29) 配列番号2に記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、前記(14)に記載のポリペプチド断片または該ポリペプチドから構成されるヒト由来の細胞表面分子に反応性を有するモノクローナル抗体またはその一部。

(30) 前記(1)乃至前記(5)のいずれかに記載のポリペプチドまたは該ポリペプチドにより構成される細胞表面分子に反応性を有するモノクローナル抗体であって、該モノクローナル抗体のマイトジェンで刺激したリンパ芽球細胞への作用が、国際寄託番号 FERM BP-5707で識別されるハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体がマイトジェンで刺激したラットリンパ芽球細胞に示す作用と実質的に同一であるモノクローナル抗体またはその一部。

(31) 前記(1)乃至前記(5)のいずれかに記載のポリペプチドまたは該ポリペプチドにより構成される細胞表面分子に反応性を有するモノクローナル抗

体であって、該モノクローナル抗体のマイトジェンで刺激したリンパ芽球細胞への作用が、国際寄託番号 FERM BP-5708で識別されるハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体がマイトジェンで刺激したラットリンパ芽球細胞に示す作用と実質的に同一であるモノクローナル抗体またはその一部。

(32) 前記(29)に記載のモノクローナル抗体またはその一部と薬学的に許容されうる担体を含んでなる医薬組成物。

(33) 該医薬組成物が、自己免疫疾患またはアレルギー性疾患の治療または該疾患症状の抑制に用いられることを特徴とする前記(32)に記載の医薬組成物。

(34) 前記(28)乃至前記(31)のいずれかに記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

(35) 前記(1)に記載のポリペプチドをコードする遺伝子であって、配列番号1に記載される塩基配列を含むヒト由来の遺伝子または配列番号4の塩基番号35乃至637に記載される塩基配列を含むラット由来の遺伝子が、マウスの内在性遺伝子に組み込まれていることを特徴とするトランスジェニックマウス。

(36) 前記(1)に記載のポリペプチドであって配列番号5に記載される遺伝子によりコードされるアミノ酸配列を有するマウス由来のポリペプチドが産生されないように、該ポリペプチドをコードするマウスの内在性遺伝子が不活性化されていることを特徴とするノックアウトマウス。

上述のように本発明の細胞表面分子(即ち、「JTT-1抗原」)は、該分子を介した細胞間接着、並びにT細胞等のリンパ球へのシグナルの伝達及び活性化リンパ球の機能制御において役割を担う側面を有する。そこで、そのような生物学的事象の一般的理解に役立てるためのみの目的で、リンパ球系細胞、細胞間接着分子、及びそれらと疾患との関係についての一般的知見を下記に記載する。従って、下記に記載する一般的な知見は、本発明を限定的に解釈するためのものではない。

リンパ球は、大別してT細胞とB細胞の2種類に分けられる。骨髄の多能性幹細胞

からリンパ球系幹細胞が分化すると、その一部は血流に乗って胸腺に到達する。胸腺で分化成熟したリンパ球はT細胞 (Thymus-derived cell : T cell) と呼ばれ、再び血中に入り全身を巡る。成熟したT細胞はCD3と呼ばれる分子を表面に持っており、この分子を持っていることがその細胞が成熟T細胞であるかどうかを区別する目印になる。CD3は有力なT細胞マーカーである。その他、T細胞はCD4またはCD8などを発現している。T細胞はさらに、Bリンパ球の抗体産生を補助するヘルパーT細胞 (Th細胞 : helper T cell) 、標的細胞にとりついて直接にそれを破壊する細胞障害性T細胞 (Tc細胞 : cytotoxic T cell : CTL) あるいはキラーT細胞、Bリンパ球の抗体産生を抑制するサブレッサーT細胞、リンフォカインなどの効果物質を分泌して遅延型アレルギーを起こすエフェクターT細胞 (effector T cell) などがある。

リンパ球系幹細胞のうち骨髄の中でそのまま分化成熟するのがB細胞である。B細胞は、適切な刺激があれば抗体を産生するようになる細胞で、抗体産生前駆細胞である。表面にはB細胞内で合成された免疫グロブリンがあり、抗原レセプターとして機能している。成熟したB細胞の表面にはIgMとIgDがともにあり、抗原刺激とT細胞からのシグナルで分化するとIgMの産生が増加し、C末端部の細胞膜結合部分が変わって分泌されるようになる。十分な刺激があると表面の免疫グロブリンもIgGやIgE、IgAに変化するとともに、それぞれのクラスの免疫グロブリンを分泌するようになる。B細胞表面の免疫グロブリンは、表面のIgということでsIgとか、細胞膜のIgということでmIgと表現されることもある。一つのB細胞の表面にあるIgはすべて同じ抗原結合部位を有する。

T細胞でもなくB細胞でもないリンパ球で、LGL (large granular lymphocyte) あるいはヌルセル (null cell) と呼ばれるものがある。この細胞には、腫瘍細胞やウイルス感染細胞の障害能力があるが、細胞障害性T細胞の場合と異なり、あらかじめ抗原刺激をしておく必要がない。そのためナチュラルキラー細胞 (NK細胞 : natural killer cell) ともいわれる。

上記のT細胞の内、CD4陽性T細胞は、抗原提供細胞によって提示された抗原に反応すると、いろいろなサイトカインを分泌し、それらのサイトカインに対するレセプターなどが新たに発現し、細胞自身も大きくなり、分裂を始め、増殖する。このような細胞レベルの反応に先立って、それぞれのT細胞に特有の抗原レセプター（T cell antigen receptor : TCR）に抗原提供細胞上の抗原ペプチドとMHCクラスII分子の複合体が結合し、それによって細胞内ではいろいろな生化学的変化が生じて核内にシグナルが伝わり、特定のDNAの転写が始まり、それぞれのタンパク質が合成される。その結果として、細胞レベルの反応が見られるようになるわけである。また、CD8陽性T細胞に関しては例えば、あるウイルスに感染した細胞を考えると、この感染した細胞はウイルスタンパク質を合成し、そのタンパク質が細胞質内のプロテアソームで分解され、一部のペプチドがTAPを経て小胞体内に入り、合成されたばかりのMHCクラスI分子と安定した複合体を形成して細胞表面にでる。これを特異的なCD8陽性T細胞が認識するが、この段階ではまだその細胞を破壊することはない。抗原に反応したこのT細胞はIL-2レセプター（IL-2R）を発現し、それにIL-2が作用すると細胞障害活性を持つCTLに分化し、次に同じ抗原ペプチド/MHCクラスI複合体に出会った時にその標的細胞を破壊して殺すことになる。CTLへ分化するのに必要なサイトカインはIL-2ばかりでなく、IFN $\gamma$ やその他のサイトカインにも類似の作用があるといわれる。このように、CTLへの分化にはT細胞の分泌するリンフォカインが必要であるが、それらのリンフォカインはCD4陽性Th1細胞（IL-2やIFN $\gamma$ などを分泌するCD4陽性T細胞）が同じウイルスに由来する抗原のペプチドをクラスII分子とともに認識して産生している。CD4陽性T細胞の助けがなくても、CD8陽性T細胞が抗原に反応してIL-2などを産生している場合もある。CD8陽性T細胞がCTLに分化すると、細胞質内に顆粒が増加してくる。この顆粒のなかにはいろいろな高分子タンパク質が含まれており、パーフォリンはその代表である。パーフォリンは補体の第5-9成分で構成される膜侵襲複合体（membrane attack complex : MAC）によく似ており、標的細胞の細胞膜に穴をあける

作用がある。その他、セリンプロテアーゼやLT、プロテオグリカン (proteoglycan) など含まれている。また、CTLに分化して抗原刺激を受けるとIFN $\gamma$ 、LT、TNFあるいはIL-2などのリンフォカインも分泌する。また、T細胞は汎血球凝集素 (植物凝集素、PHA) やコンカナバリンA (Con A) に反応して芽球化現象を示す。

また、まだ何も刺激を受けていない状態の成熟T細胞は、静止期T細胞 (resting T cell) と呼ばれ、細胞の大きさが小さく、寿命も数日で短い。刺激を受けると、すでに述べたように細胞は大きくなり、いろいろな刺激に対してさらに反応しやすくなる。このようなT細胞を活性化T細胞 (activated T cell) と呼ぶ。一部の活性化T細胞は、記憶T細胞 (memory T cell) となり、同じ抗原刺激を受けると二次免疫反応をもたらすことになる。記憶T細胞は数年あるいは数十年も体内を循環し続けるといわれている。

B細胞でまだ何も刺激を受けていない状態のものを、T細胞の場合と同じように静止期B細胞 (resting B cell) といい、多価の抗原やCD40Lで刺激され、増殖を起こしたようなB細胞を活性化B細胞 (activated B cell) という。静止期B細胞には、B7-1 (CD80) やB7-2 (CD86) のようなコスティミュレーター分子 (TCRを介したシグナルとともにT細胞を刺激する分子) がなく、静止期T細胞に抗原を提供してもTCRを刺激するだけで、CD40リガンド (CD40L) を発現させたり、リンフォカインを産生させたりすることができないといわれている。そのため、ほかの抗原提供細胞によって抗原刺激され、活性化されたヘルパーT細胞が静止期B細胞の抗原提示に反応するものと考えられている。すなわち、抗原が侵入してきた場合には、まずB7分子を発現している樹状細胞 (著しい樹状の突起を有する細胞) や微生物に反応して活性化されたマクロファージがその抗原を提示して、休止期ヘルパーT細胞を刺激し、CD40Lを発現させるなど活性化してから、同じ抗原を提示する静止期B細胞に結合してそのCD40を刺激すると考えられている。多価の抗原やCD40Lで刺激されて一度活性化されると、B細胞もB7分子を発現し、TCRとともに表面のCD28を刺激してそのヘルパーT細胞を活性化し、CD40Lを発現させたり、リン

フォカインを産生させたりすることができる。また、刺激を受けて細胞が大きくなるなどの変化は見られるものの、抗体の分泌はほとんど見られない状態のB細胞を活性化B細胞 (activated B cell) という。さらに成熟B細胞になって抗原に出会うと、T細胞からの刺激も加わってIgMの産生が高まり、産生するIgMが膜型から分泌型に変わって分泌されるようになる。さらに、T細胞からの液性因子によってIgMからIgGなどのほかのアイソタイプの抗体を産生するようになる。これをアイソタイプスイッチあるいはクラススイッチという。抗体を分泌するようになったB細胞は抗体分泌細胞 (antibody-secreting cell) と呼ばれるようになり、一部は形態学的にも特徴のある細胞となり、形質細胞 (plasma cell) と呼ばれる (免疫学の知識、オーム社(1996))。

ところで免疫系の様々な反応において、白血球はそのサブポピュレーション、即ち、Tリンパ球、Bリンパ球、NK、好中球などがそれぞれ異なった動態を示す場合が多い。また、上記のように同じリンパ球であっても、その細胞の状態、即ち、活性化しているか、静止期にあるかにより、それぞれ異なった動態を示す。これらの事実は、白血球のサブポピュレーション特異的な認識機構、さらには細胞の状態に特異的な認識機構、特に細胞接着分子 (細胞接着タンパク質) の存在を示唆するものである。

細胞接着分子、即ち、細胞接着タンパク質は、一般に、個体の発生・分化の際に、あるいは細胞の局所への遊走の際に、細胞同士を互いに接着させる機能を有する分子であり、生体の有機的かつ機能的な連絡にとって必須の分子であることが知られている。

細胞接着分子は、その構造的特徴から大きく免疫グロブリンスーパーファミリー、インテグリンファミリー、セクレチンファミリー、カドヘリンファミリー、CD44ファミリーの5つに分類されている。免疫グロブリンスーパーファミリーに属する接着分子は、ジスルフィド結合で形成されるループ様ドメインを繰り返し持つことを特徴としており、「ICAM-1」 (intercellular adhesion molecule-1)、

「VCAM-1」 (vascular cell adhesion molecule-1) などの分子が知られている。また、インテグリンファミリーに属する接着分子は、 $\alpha/\beta$ ヘテロダイマー構造を特徴とし、「VLA-1~6」 (very late antigen-1~6)、「LFA-1」 (lymphocyte function-associated antigen-1)、「Mac-1」、「p150/90」などが知られている。セクレチンファミリーに属する分子は、N末端から順に、レクチン様ドメイン、EGF様ドメイン、補体ドメインを有し、「E-セレクトイン」、「P-セレクトイン」などが知られている。さらに、カドヘリンファミリーとしては、「E-カドヘリン」、「N-カドヘリン」、「P-カドヘリン」が、CD44ファミリーには、「CD44」が知られている。

これら接着分子の具体的な機能としては、白血球の血管内皮細胞への接着やリンパ球の抗原提示細胞への接着などが知られているが、近年における様々な研究から、これらの機能のみならず種々の疾患にも関係していることが徐々に明らかとなってきた。

特に、疾患と接着分子の発現異常に関しては、多くの報告がなされている。例えば、慢性関節リウマチ (RA) については、RA滑膜細胞において、「Mac-1」と「p150/95」の両者の発現が増強していることが報告されている (Allen, C et al. *Arthritis Rheum.*, 32, 947 (1989))。また、RA滑膜では、様々な細胞が「ICAM-1」を強く、かつ異所性に発現していることが報告されている (Hale, L. et al. *Arthritis Rheum.*, 32, 22 (1989))。さらに、「ELAM-1」も好中球と血管内皮細胞の接着に関与しており、これら分子の過剰発現は、RA関節液中に見られる好中球の浸潤 (特に関節液中への) に関与していることが示唆されている (Laffon, A., et al. *Arthritis Rheum.*, 32, 386 (1989))。さらに、「CD44」もRA滑膜において、血管内皮細胞、A型滑膜細胞に強く発現していることが報告されている (Heynes, B. et al. *Arthritis Rheum.*, 34, 1434 (1991))。

また、全身性エリデマトーデス (SLE) と接着分子の発現異常との関係についても例があり、例えば、SLE患者ではTリンパ球の培養血管内皮細胞に対する接着能

が健康人と比較すると低下していることが報告されている。また、SLE患者の抹消リンパ球における接着分子の発現検討では、「ICAM-1」、「VLA-4」、「IFA-1」の増強傾向が見られている (Haskard, D.O. et al, Rheumatol. Int, 9, 33 (1989))。

自己免疫性甲状腺疾患については、甲状腺濾胞細胞をインターフェロン- $\gamma$ 、インターロイキン-1、腫瘍壊死因子で刺激すると「ICAM-1」が発現すること、濾胞細胞と単核細胞とのクラスター形成が、抗「ICAM-1」抗体により抑制されることが報告されている (Weetman, A.P., et al. Eur. J. Immunol., 20, 271 (1990))。

肝炎では、肝細胞と炎症細胞間の接着が「ICAM-1」と「LFA-3」、「LFA-1」と「CD2」という2つの経路で行なわれることでその機会を増加させ、抗原の提示や炎症細胞の活性化が促進されと考えられている。特に、B型肝炎における検討では「LFA-3」がウイルス増殖の盛んな肝細胞に強く発現し、「ICAM-1」が肝炎の程度によく相関していることから、「LFA-3」がウイルスの排除に関与し、また「ICAM-1」がT細胞への抗原提示を促進させ炎症反応を調節していることが示唆されている。「ICAM-1」陰性でHBc抗原陽性の肝細胞の場合はリンパ球との細胞間相互作用が起こらずウイルス感染の慢性化という一種の免疫不応答の状態が生じるのではないかと考えられる。急性肝炎や慢性活動性肝炎、肝硬変患者の血清「ICAM-1」濃度が健常者や慢性持続性肝炎患者よりも高く、また活動性肝炎患者のうちでも組織学的に進行した症例で高値を認めることから慢性肝疾患における血清「ICAM-1」が肝細胞の障害の程度と相関するとの報告もなされている (Mod. Phys. 15, (1), 73-76 (1995))。

動脈硬化のモデル動物では、その病変発症のごく初期において血管内皮への単球やリンパ球の接着、侵入が認められ、これら血球細胞と内皮の相互作用が動脈硬化発症の第一段階と考えられている。また、実際の動脈硬化巣における接着分子の発現については、種々の報告がなされている。例えば、ヒト動脈硬化巣における「ICAM-1」の発現 (Poston RN, et al. Am J Patol, 140, 665 (1992)) や高コレ



ステロール血症ウサギの動脈硬化巣における「VCAM-1」の発現 (Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Science, 251, 788(1991)) について報告例がある。さらに最近、ヒトの動脈硬化巣においても「VCAM-1」が発現していることが観察されており、その発現が特に内膜に遊走した平滑筋細胞と単球/マクロファージに強く認められたことが報告されている。また、ウサギおよびヒト動脈硬化巣において「MCP-1」の発現亢進が認められており、「MCP-1」が単球/マクロファージの遊走を介して動脈硬化巣の形成を促進しているという示唆もある (カレントセラピー, 12, (8), 1485-1488(1994))。

さらに、癌転移と接着分子異常の関係についても報告がある。例えば、E-カドヘリンの低下した癌細胞は、強い侵襲性を示すが、これにE-カドヘリンのcDNAを導入すると侵襲性が抑制され、さらに、E-カドヘリン抗血清を添加すると侵襲性が回復することが見出されており、E-カドヘリンの発現低下と癌細胞の侵襲性の密接な関連が示唆されている (Frixen, U.H., et al. 113, 173(1991))。実際の臨床例においても、肝癌、食道癌、胃癌、乳癌など種々の癌でE-カドヘリンの発現低下と転移との関係が指摘されている。また、「VCAM-1」のリガンドである「VLA-4」は転移性メラノーマ、胃癌、乳癌などで高発現することが報告されており、これらが転移に際して血管内皮細胞への着床に利用される可能性が示唆されている。また、種々の癌細胞株を用いた実験から胃癌、大腸癌、肺癌、肝癌、膵癌などの上皮性の癌はE-セレクチンを介して血管内皮細胞に接着するとの報告もなされている (Takada, A., et al. Cancer Res., 53, 354(1993))。

一方、これら接着分子を標的とした疾患治療の試みもなされている。例えば、抗ラット「ICAM-1」抗体がラット自己免疫性関節炎モデルでの炎症反応を強く抑えることが報告されている。また、RAの動物モデルの一つとされるアジュバンド滑膜炎では、抗「ICAM-1」抗体を投与することにより、関節炎の発症が抑制されることが報告されている (日本臨床免疫学会誌, 14, (6), 571-577(1991))。さらに、一部のインテグリンが認識し結合する細胞外マトリックス蛋白上のアミノ酸

配列であるREG配列のペプチドを多量に胆癌マウスへ投与すると、接種腫瘍の転移形成が顕著に抑制され、またインビトロの系では、RGDペプチドや抗 $\beta$ 1サブユニット抗体が癌細胞の運動や浸潤を抑制することが報告されている (Yamada, K.M., et al. Cancer Res, 50, 4485, (1990))。

以下、本発明で用いる語句の意味並びに本発明のポリペプチド、融合ポリペプチド、遺伝子、抗体、トランスジェニックマウス、ノックアウトマウス等の一般的製造方法を明らかにすることにより本発明を詳細に説明する。しかしながら、該用語の意味がそのような定義を以て限定的に解釈されるものではないことは言うまでもない。

本発明における「マイトジェン」とは、分裂促進剤とも呼ばれ、細胞分裂を誘起する物質を指す。免疫学的には、抗原非特異的（ポリクローナル）にリンパ球を幼弱化し分裂を誘起させるものを意味する。例えば、PHAやPWMなどのレクチン、コンカナバリンA (Concanavalin A; ConA)、リボ多糖、ストレプトリシンS、抗リンパ球抗体などが挙げられる。コンカナバリンAやPHAは、Tリンパ球のみに作用し、リボ多糖はBリンパ球のみに作用し、PWMは両リンパ球に作用することが知られている。

本願明細書中で用いられる「リンパ芽球細胞」なる用語は、大リンパ球、リンホブラスト (lymphoblast) あるいは免疫芽細胞とも呼ばれ、リンパ性組織（リンパ節、脾臓、胸腺、骨髓、リンパ管、扁桃腺など）や血液中に存在するリンパ球の内の大リンパ球に属するリンパ球を指す。

本願明細書中で用いられる「活性化リンパ球」なる用語は、例えば下記のようなリンパ球を意味するがこの限りではない。例えば、何らかの刺激により活性化されたリンパ球を指す。前述のとおりリンパ球は、T細胞、B細胞、およびナチュラルキラー細胞に分類され、さらにT細胞についてはCD4陽性細胞とCD8陽性細胞に分類することができる。従って、本発明の「活性化リンパ球」には、主に活性化T細胞、活性化B細胞、および活性化ナチュラルキラー細胞が含まれ、さらに活性

化T細胞には活性化CD4陽性細胞と活性化CD8陽性細胞が含まれる。

CD4陽性T細胞は、抗原提供細胞によって提示された抗原に反応すると、いろいろなサイトカインを分泌し、それらのサイトカインに対するレセプターなどが新たに発現し、細胞自身も大きくなり、分裂を始め、増殖して活性化される。活性化CD4陽性T細胞とは、このような状態のCD4陽性T細胞を指す。

CD8陽性T細胞は、抗原に反応するとIL-2Rを発現し、それにIL-2が作用すると細胞障害性をもつCTLに分化し、次に同じ抗原ペプチド/MHCクラスI複合体に出会った時にその標的細胞を破壊して殺すようになる。CD8陽性T細胞がCTLに分化すると、細胞質内に顆粒が増加してくる。この顆粒の中にはいろいろな高分子タンパク質が含まれており、パーフォリンはその代表である。パーフォリンは補体の第5-9成分で構成されるMACによく似ており、標的細胞の細胞膜に穴をあける作用がある。その他、セリンプロテアーゼやLT、プロテオグリカン (proteoglycan) など含まれている。また、CTLに分化して抗原刺激を受けるとIFN $\gamma$ 、LT、TNFあるいはIL-2などのリンフォカインも分泌する。活性化CD8陽性T細胞とは、このような状態のCD8陽性T細胞を指す。

T細胞は汎血球凝集素（植物凝集素、PHA）やコンカナバリンA (Con A) に反応して芽球化現象を示すが、このような状態のT細胞も活性化T細胞に含まれる。

B細胞では、B7分子を発現し、TCRとともに表面のCD28を刺激してそのヘルパーT細胞を活性化し、CD40Lを発現させたり、リンフォカインを産生したりし、刺激を受けて細胞が大きくなったり、増殖を起こすなどの変化が見られる。活性化B細胞とは、このような状態のB細胞を指し、本発明においては、抗体を分泌するようになったB細胞（抗体分泌細胞(antibody-secreting cell)及び形質細胞(plasma cell)）も活性化B細胞に含まれる。

活性化ナチュラルキラー細胞とは、前述のとおり腫瘍細胞やウイルス感染細胞の障害作用を示すナチュラルキラー細胞を指す。なお、本発明においては、コンカナバリンA (Con A) で刺激された胸腺細胞も活性化リンパ球に含まれる。

本発明において用いられる「活性化リンパ芽球細胞」には、前記のような「リンパ芽球」が、コンカナバリンAのような前記「マイトジェン」で刺激を受けて活性化されたリンパ芽球が含まれる。

本願明細書で場合によって用いられる「静止期リンパ球」なる用語は、前述の活性化リンパ球と対照的に、細胞の活性化のための刺激を受けていない非活性化状態のリンパ球を指す。

本発明における「遺伝子」には、ゲノミックDNAおよびcDNAが含まれる。

本発明において「ヒト由来」とは、ヒトの生体成分（臓器、組織、細胞、体液など）から単離された天然の物質、遺伝子組換え技術を用いて作製される組み換え物質を含み、また該物質がタンパク質あるいはポリペプチドである場合には、それらのアミノ酸配列中のアミノ酸の1もしくは数個のアミノ酸配列が置換、欠失もしくは付加したアミノ酸配列を有する人工のタンパク質及びポリペプチドも含まれる。

本発明の「細胞表面分子」とは、ヒト、ラット、マウス、モルモット及びウサギなどの哺乳動物に由来する細胞表面分子であり、好ましくはヒト、ラットまたはマウスに由来する細胞表面分子であり、より好ましくはヒト由来の細胞表面分子である。

本発明の「細胞表面分子」は、具体的には、少なくとも下記の性質を有することを特徴とする細胞表面分子である。

(a) 少なくとも胸腺細胞及びマイトジェン (mitogen) で刺激したリンパ芽球細胞で発現する；

(b) 該細胞表面分子に反応性を有する抗体は、マイトジェンで刺激したリンパ芽球細胞間の接着を誘導する；

(c) 該細胞表面分子に反応性を有する抗体は、CD 3に反応性を有する抗体との共存下で末梢血リンパ球の増殖を誘導する；

(d) 細胞外領域にPhe-Asp-Pro-Pro-Pro-Pheで表わされる部分アミノ酸配列を

有する；及び

(e) 細胞内領域にTyr-Met-Phe-Metで表わされる部分アミノ酸配列を有する。

好ましい態様としては後述する本発明の「ポリペプチド」から構成される細胞表面分子である。

本発明の「ポリペプチド」とは、上記の本発明の「細胞表面分子」を構成するポリペプチドであり、具体的には下記が挙げられる。

(1) 配列番号1に記載の塩基配列からなるDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされるポリペプチド。

(2) 配列番号2に記載のアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド。

(3) 配列番号2に記載されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド（即ち、「ヒトJTT-1抗原」を構成するポリペプチド及びその誘導体）。

(4) 配列番号3の塩基番号26乃至625に記載の塩基配列によりコードされるアミノ酸配列または該アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド（即ち、「ヒトJTT-1抗原」を構成するポリペプチド及びその誘導体）。

(5) 配列番号4の塩基番号35乃至637に記載の塩基配列によりコードされるアミノ酸配列または該アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド（即ち、「ラットJTT-1抗原」を構成するポリペプチド及びその誘導体）。

(6) 配列番号5の塩基番号1乃至603に記載の塩基配列によりコードされるアミノ酸配列または該アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド（即ち、「マウスJTT-1抗原」を構成するポリペプチド及びその誘導体）。

(7) 配列番号6の塩基番号35乃至685に記載の塩基配列によりコードされるアミノ酸配列または該アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド（即ち、「ラットJTT-1抗原の変異体」を構成するポリペプチド及びその誘導体）。

(8) 国際寄託番号FERM BP-5725識別される形質転換体に導入された本発明の細胞表面分子を構成するポリペプチドをコードするDNAによりコードされるアミノ酸配列または該アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド(即ち、「ヒトJTT-1抗原」を構成するポリペプチド及びその誘導体)。

ここで「ストリンジェントな条件下」としては、例えば、次のような条件を挙げることができる。例えば、50塩基以上のプローブを用い、0.9%NaCl下でハイブリダイゼーションを行う場合には、50%の解離を生ずる温度( $T_m$ )を目安を下記計算式から求め、ハイブリダイゼーションの温度を下記計算式のように設定することができる。

$$T_m = 82.3^{\circ}\text{C} + 0.41 \times (\text{G+C}) \% - 500/n - 0.61 \times (\text{フォルムアミド}) \%$$

( $n$ はプローブの塩基数を示す。)

$$\text{温度} = T_m - 25^{\circ}\text{C}$$

また、100塩基以上のプローブ( $\text{G+C}=40\sim 50\%$ の場合)を用いる場合には、 $T_m$ が下記(1)及び(2)のように変化することを目安する。

(1) 1%ミスマッチ毎に、 $T_m$ が約 $1^{\circ}\text{C}$ 下がる。

(2) フォルムアミド1%毎に、 $T_m$ が $0.6\sim 0.7^{\circ}\text{C}$ 下がる。

従って、完全相補鎖の組み合わせの場合の温度条件は下記のようにすることができる。

(A)  $65\sim 75^{\circ}\text{C}$  (フォルムアミド無添加)

(B)  $35\sim 45^{\circ}\text{C}$  (50%フォルムアミド存在下)

また、不完全相補鎖の組み合わせの場合の温度条件は下記のようにすることができる。

(A)  $45\sim 55^{\circ}\text{C}$  (フォルムアミド無添加)

(B)  $35\sim 42^{\circ}\text{C}$  (30%フォルムアミド存在下)

また、23塩基以下のプローブを用いる場合の温度条件は、 $37^{\circ}\text{C}$ とすることもできるし、また下記計算式を目安とすることもできる。

$$\text{温度} = 2^{\circ}\text{C} \times (\text{A+Tの数}) + 4^{\circ}\text{C} \times (\text{C+Gの数}) - 5^{\circ}\text{C}$$

ここで「実質的に同一のアミノ酸配列を有する」とは、配列表に記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと実質的に同等の生物学的性質を有する限り、該アミノ酸配列中の複数個のアミノ酸、好ましくは1乃至10個のアミノ酸、特に好ましくは1乃至5個のアミノ酸が置換、欠失及び／または修飾されているアミノ酸配列を有するポリペプチド、並びに該アミノ酸配列に、複数個のアミノ酸、好ましくは1乃至10個のアミノ酸、特に好ましくは1乃至5個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドをも包含することを意味する。

そのようなアミノ酸の置換、欠失、または挿入は常法に従って行うことができる（実験医学別冊・「遺伝子工学ハンドブック」（1992）など）。

例えば、合成オリゴヌクレオチド指定突然変異導入法（gapped duplex）法、亜硝酸あるいは亜硫酸処理によってランダムに点突然変異を導入する方法、Ba131酵素等により欠失変異体を作製する方法、カセット変異法、リンカースキャニング法、ミスインコーポレーション法、ミスマッチプライマー法、DNAセグメント合成法などを挙げることができる。

合成オリゴヌクレオチド指定突然変異導入（gapped duplex）法は、例えば下記のように行うことができる。アンバー変異をもつM13ファージベクターに変異誘起を希望する領域をクローニングし、一本鎖ファージDNAを調製する。アンバー変異をもたないM13ベクターのRFIDNAを制限酵素処理により線状とし、上記の一本鎖ファージDNAと混合して変性後、アニールさせ、「gapped duplex DNA」を形成させる。これに変異を導入した合成オリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせ、DNAポリメラーゼとDNAリガーゼの反応により閉環状2本鎖DNAとする。このDNAをミスマッチ修飾能が欠損している大腸菌mutS株にトランスフェクションし、増殖したファージをサプレッサー機能のない大腸菌に感染させ、アンバー変異を持たないファージだけを選択する。

また、亜硝酸による点突然変異を導入する方法は、例えば下記のような原理を

利用する。DNAを亜硝酸処理すると塩基が脱アミノ化されて、アデニンはヒポキサンチンに、シトシンはウラシルに、グアニンはキサンチンになる。脱アミノ化されたDNAを細胞に導入すると、DNA複製時にヒポキサンチンはシトシンと、ウラシルはアデニンとキサンチンはチミンと塩基対を形成するため、「A:T」が「G:C」へ、「G:C」が「A:T」へと置換する。実際には亜硝酸処理した一本鎖DNA断片を「gapped duplex DNA」にハイブリダイズさせ、以下、合成オリゴヌクレオチド指定突然変異導入 (gapped duplex) 法と同様に操作して変異株を分離すればよい。

なお、本願明細書または図面においてアミノ酸を表記するために用いられるアルファベットの三文字あるいは一文字は、各々次に示すアミノ酸を意味する。

(Gly/G) グリシン、(Ala/A) アラニン、(Val/V) バリン、(Leu/L) ロイシン、(Ile/I) イソロイシン、(Ser/S) セリン、(Thr/T) スレオニン、(Asp/D) アスパラギン酸、(Glu/E) グルタミン酸、(Asn/N) アスパラギン、(Glu/Q) グルタミン、(Lys/K) リジン、(Arg/R) アルギニン、(Cys/C) システイン、(Met/M) メチオニン、(Phe/F) フェニルアラニン、(Tyr/Y) チロシン、(Trp/W) トリプトファン、(His/H) ヒスチジン、(Pro/P) プロリン。

前述した本発明の「細胞表面分子」を構成する「ポリペプチド」は、細胞膜を貫通する細胞膜貫通蛋白であり、この細胞膜貫通ポリペプチドの1または2により該「細胞表面分子」が構成される。

ここで「細胞膜貫通蛋白」とは、多くの受容体あるいは細胞膜表面分子に見られるように、膜の脂質二重層を1回または数回貫通する疎水性ペプチド領域により膜と連結し、全体として細胞外領域(extracellular region)、膜貫通領域(transmembrane region)及び細胞質領域(cytoplasmic region)の3つの主領域から構成される構造をとる蛋白を指す。さらにそのような膜貫通性蛋白は、モノマー(monomer)として、または、同一のアミノ酸配列を有するもう1本の鎖あるいは異なるアミノ酸配列を有する鎖とともにそれぞれホモダイマー(homodimer)、ヘテ



ロダイマー(heterodimer)あるいはオリゴマー(origomer)を形成して存在することにより、各々の受容体や細胞表面分子を構成する。

本発明の「ポリペプチド断片」とは、前述に定義した本発明の「ポリペプチド」のポリペプチド断片であり、好ましくは該ポリペプチドの細胞外領域である。該領域は所望応じそのN末端及び／またはC末端に1乃至5のアミノ酸が付加されていてもよい。

ここで「細胞外領域」とは、前述のような細胞膜膜貫通蛋白の全体構造のうち、該膜蛋白が連結している膜の外界側に存在する部分構造（部分領域）の全部または一部を意味し、換言すれば、膜内に取り込まれている領域（膜貫通領域）及び該膜内の領域に引き続いて細胞質内に存在する領域（細胞内領域）以外の領域の全部または一部を意味する。

本発明における「ヒトの免疫グロブリン(Ig)の重鎖の定常領域または定常領域の一部」とは、前述のようなヒト由来の免疫グロブリンの重鎖(Heavy Chain, H鎖)の定常領域(Constant region)、Fc領域またはそれらの一部を意味する。該免疫グロブリンは、どのようなクラス及びサブクラスに属する免疫グロブリンであってもよく、具体的には、IgG(IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4)、IgM、IgA(IgA1及びIgA2)、IgD及びIgEを挙げることができる。好ましくは、IgG(IgG1、IgG2、IgG3若しくはIgG4)またはIgMである。本発明における特に好ましい例としては、ヒト由来のIgG(IgG1、IgG2、IgG3若しくはIgG4)に属する免疫グロブリンである。

免疫グロブリンは、2つの相同な軽鎖(Light Chain, L鎖)と2つの相同な重鎖(Heavy Chain, H鎖)の4つの鎖が、ジスルフィド結合(S-S結合)で結合したY字形の構造単位を有する。軽鎖は、軽鎖可変領域(VL)及び軽鎖定常領域(CL)から構成される。重鎖は、重鎖可変領域(VH)と重鎖定常領域(CH)から構成される。

重鎖定常領域は、クラス (I g G、I g M、I g A、I g D 及び I g E) 並びにサブクラス (I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1 及び I g A 2) 毎に各々固有のアミノ酸配列を有するいくつかのドメインから構成される。

I g G (I g G 1、I g G 2、I g G 3 及び I g G 4) の重鎖は、N 末端から順に、VH、CH1 ドメイン、ヒンジ領域、CH2 ドメイン 及び CH3 ドメインから構成される。

同様に I g G 1 の重鎖は、N 末端から順に、VH、C $\gamma$ <sub>1</sub>1 ドメイン、ヒンジ領域、C $\gamma$ <sub>1</sub>2 ドメイン 及び C $\gamma$ <sub>1</sub>3 ドメインから構成される。I g G 2 の重鎖は、N 末端から順に、VH、C $\gamma$ <sub>2</sub>1 ドメイン、ヒンジ領域、C $\gamma$ <sub>2</sub>2 ドメイン 及び C $\gamma$ <sub>2</sub>3 ドメインから構成される。I g G 3 の重鎖は、N 末端から順に、VH、C $\gamma$ <sub>3</sub>1 ドメイン、ヒンジ領域、C $\gamma$ <sub>3</sub>2 ドメイン 及び C $\gamma$ <sub>3</sub>3 ドメインから構成される。I g G 4 の重鎖は、N 末端から順に、VH、C $\gamma$ <sub>4</sub>1 ドメイン、ヒンジ領域、C $\gamma$ <sub>4</sub>2 ドメイン 及び C $\gamma$ <sub>4</sub>3 ドメインから構成される。

I g A の重鎖は、N 末端から順に、VH、C $\alpha$ 1 ドメイン、ヒンジ領域、C $\alpha$ 2 ドメイン 及び C $\alpha$ 3 ドメインから構成される。

同様に I g A 1 の重鎖は、N 末端から順に、VH、C $\alpha$ <sub>1</sub>1 ドメイン、ヒンジ領域、C $\alpha$ <sub>1</sub>2 ドメイン 及び C $\alpha$ <sub>1</sub>3 ドメインから構成される。I g A 2 の重鎖は、N 末端から順に、VH、C $\alpha$ <sub>2</sub>1 ドメイン、ヒンジ領域、C $\alpha$ <sub>2</sub>2 ドメイン 及び C $\alpha$ <sub>2</sub>3 ドメインから構成される。

I g D の重鎖は、N 末端から順に、VH、C $\delta$ 1 ドメイン、ヒンジ領域、C $\delta$ 2 ドメイン 及び C $\delta$ 3 ドメインから構成される。

I g M の重鎖は、N 末端から順に、VH、C $\mu$ 1 ドメイン、C $\mu$ 2 ドメイン、C $\mu$ 3 ドメイン 及び C $\mu$ 4 ドメインから構成され、I g G、I g A 及び I g D に見られるようなヒンジ領域を有しない。

I g E の重鎖は、N 末端から順に、VH、C $\epsilon$ 1 ドメイン、C $\epsilon$ 2 ドメイン、C $\epsilon$ 3 ドメイン 及び C $\epsilon$ 4 ドメインから構成され、I g G、I g A 及び I g D に

見られるようなヒンジ領域を有しない。

さらに、I g Gを例に挙げるならば、I g Gをババインで処理すると、2つの重鎖を連結させているヒンジ領域中に存在するジスルフィド結合のややN末端側で切断されて、VH及びCH1からなる重鎖断片と1つの軽鎖がジスルフィド結合で連結した2つの相同なF a b、並びにヒンジ領域、CH2ドメイン及びCH3ドメインからなる2つの相同な重鎖断片がジスルフィド結合で連結した1つのF cを生ずる（以上、「免疫学イラストレイテッド」、原書第2版、第65～75頁、1992年、南江堂発行、及び「最新医科学の焦点「免疫系の認識機構」」、第4～7頁、1991年、南江堂発行など参照）。

即ち、本発明における「免疫グロブリンの重鎖の定常領域の一部」とは、上述のような構造的特徴を有する免疫グロブリンの重鎖の定常領域一部を意味し、好ましくは、C1ドメインを欠く定常領域またはF c領域である。具体的には、I g G、I g AまたはI g Dの場合には、各々のヒンジ領域、C2ドメイン及びC3ドメインからなる領域が挙げられ、I g MまたはI g Eの場合には、各々のC2ドメイン、C3ドメイン及びC4ドメインからなる領域が挙げられる。とりわけ好ましい例としては、ヒト由来のI g G1のF c領域を挙げることができる。

本発明の「融合ポリペプチド」とは、前記の定義されたとおりの本発明の「細胞表面分子」を構成する「ポリペプチド」の細胞外領域と「ヒトの免疫グロブリン（I g）の重鎖の定常領域または定常領域の一部」とからなる融合ポリペプチドである。好ましくは本発明のポリペプチドの細胞外領域とヒトI g Gの重鎖の定常領域の一部との融合ポリペプチドであり、特に好ましくは本発明のポリペプチドの細胞外領域とヒトI g Gの重鎖のヒンジ領域、CH2ドメイン及びCH3ドメインからなる領域（F c）との融合ポリペプチドである。なお、I g Gとしては、I g G1が好ましい。また、本発明のポリペプチドとしては、ヒト、マウスまたはラット（好ましくはヒト）に由来するポリペプチドが好ましい。

本発明の融合ポリペプチドは、前述のようなI g G等の免疫グロブリンの定常領

域の一部（例えば、Fc）を融合パートナーとして有することから、該免疫グロブリン断片に特異的に結合するというプロテインAの性質を用いたアフィニティークラムクロマトグラフィーを用いることにより該融合ポリペプチドを極めて容易に精製することが可能であるという点で利点を有する。さらに、種々の免疫グロブリンのFcに対する種々の抗体が提供されていることから、該Fcに対する抗体を用いて、該融合ポリペプチドのイムノアッセイを簡便に行うことができる。

本発明のポリペプチド、ポリペプチド断片及び融合ポリペプチドは、後述するような遺伝子組換え技術のほか、化学的合成法、細胞培養方法等のような当該技術的分野において知られる公知の方法あるいはその修飾方法を適宜用いることにより製造することができる。

本発明の「遺伝子」は、前述の本発明のポリペプチドまたはポリペプチド断片をコードするDNAからなる遺伝子であって、本発明のポリペプチドまたはポリペプチド断片をコードし得るいかなる塩基配列を有する遺伝子をも包含する。

具体的な態様としては、下記ポリペプチドまたはそのポリペプチド断片をコードする遺伝子である。

（１）配列番号１に記載の塩基配列からなるDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされるポリペプチド。

（２）配列番号２に記載のアミノ酸配列と６０％以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド。

（３）配列番号２に記載されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド（即ち、「ヒトJTT-1抗原」を構成するポリペプチド及びその誘導体）。

（４）配列番号３の塩基番号２６乃至６２５に記載の塩基配列によりコードされるアミノ酸配列または該アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド（即ち、「ヒトJTT-1抗原」を構成するポリペプチド及びその誘導体）。

（５）配列番号４の塩基番号３５乃至６３７に記載の塩基配列によりコードされるアミ

ノ酸配列または該アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド（即ち、「ラットJTT-1抗原」を構成するポリペプチド及びその誘導体）。

（６）配列番号５の塩基番号１乃至６０３に記載の塩基配列によりコードされるアミノ酸配列または該アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド（即ち、「マウスJTT-1抗原」を構成するポリペプチド及びその誘導体）。

（７）配列番号６の塩基番号３５乃至６８５に記載の塩基配列によりコードされるアミノ酸配列または該アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド（即ち、「ラットJTT-1抗原の変異体」を構成するポリペプチド及びその誘導体）。

（８）国際寄託番号FERM BP-5725識別される形質転換体に導入された本発明の細胞表面分子を構成するポリペプチドをコードするDNAによりコードされるアミノ酸配列または該アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド（即ち、「ヒトJTT-1抗原」を構成するポリペプチド及びその誘導体）。

ここで「実質的に同一のアミノ酸配列を有する」とは、前記に定義したような意味を有する。

さらに具体的な態様としては、下記DNAまたはその断片が挙げられる。

（１）配列番号１に記載の塩基配列からなるDNA、並びに該DNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

（４）配列番号３の塩基番号２６乃至６２５に記載の塩基配列を含むDNA。

（５）配列番号４の塩基番号３５乃至６３７に記載の塩基配列を含むDNA。

（６）配列番号５の塩基番号１乃至６０３に記載の塩基配列を含むDNA。

（７）配列番号６の塩基番号３５乃至６８５に記載の塩基配列を含むDNA。

（８）国際寄託番号FERM BP-5725識別される形質転換体に導入された本発明の細胞表面分子を構成するポリペプチドをコードするDNA。

また、本発明における融合ポリペプチドの一部である免疫グロブリンの重鎖の定常領域の一部をコードするDNAとしては、cDNAであっても良いし、また

各エクソン（例えば、CH1ドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメイン、CH3ドメイン、CH4ドメインなどをコードするDNA）の間にイントロンを含むようなゲノミックDNAであっても良い。

本発明においては、同一のアミノ酸をコードするコドンであればどのようなコドンから構成されるDNAを含む。

また、本発明のDNAは、いかなる方法で得られるものであってもよい。例えばmRNAから調製される相補DNA（cDNA）、ゲノムDNAから調製されるDNA、化学合成によって得られるDNA、RNAまたはDNAを鋳型としてPCR法で増幅させて得られるDNAおよびこれらの方法を適当に組み合わせて構築されるDNAをも全て包含するものである。

本発明のポリペプチドをコードするDNAは、常法に従って本発明のポリペプチドのmRNAからcDNAをクローン化する方法、ゲノムDNAを単離してスプライシング処理する方法、化学合成する方法等により取得することができる。

（1）例えば、本発明のポリペプチドのmRNAからcDNAをクローン化する方法としては、以下の方法が例示される。

まず、本発明の細胞表面分子（ポリペプチド）を発現・産生する組織あるいは細胞（例えば、胸腺細胞やConA刺激した脾臓由来リンパ芽球細胞）から該本発明のポリペプチドをコードするmRNAを調製する。mRNAの調製は、例えばグアニジンチオシアネート法（Chirgwin J.M. et al, Biochemistry, Vol.18, p.5294, 1979）、熱フェノール法もしくはAGPC法等の公知の方法を用いて調製した全RNAをオリゴ（dT）セルロースやポリU-セファロース等によるアフィニティクロマトグラフィーにかけることによって行うことができる。

次いで得られたmRNAを鋳型として、例えば逆転写酵素を用いる等の公知の方法、例えばオカヤマらの方法（モレキュラーセルバイオロジー（Mol.Cell.Biol.）、第2巻、第161頁、1982年及び同誌 第3巻、第280頁、1983年）や Hoffman（Hoffman）らの方法（ジーン（Gene）、第25巻、第263

頁、1983年)等によりcDNA鎖を合成し、cDNAの二本鎖cDNAへの変換を行う。このcDNAをプラスミドベクター、ファージベクターまたはコスミドベクターに組み込み、大腸菌を形質転換して、あるいはインビトロパッケージング後、大腸菌に形質移入(トランスフェクト)することによりcDNAライブラリーを作製する。

ここで用いられるプラスミドベクターとしては、宿主内で複製保持されるものであれば特に制限されず、また用いられるファージベクターとしても宿主内で増殖できるものであれば良い。常法的に用いられるクローニング用ベクターとしてpME18S、 $\lambda$ ZAPII (IZAPII)、pUC19、 $\lambda$ gt10、 $\lambda$ gt11等が例示される。ただし、後述の免疫学的スクリーニングに供する場合は、宿主内で本発明のポリペプチドをコードする遺伝子を発現させうるプロモーターを有したベクターであることが好ましい。

プラスミドにcDNAを組み込む方法としては、例えばマニアティス (Maniatis) らの方法(モレキュラークローニング、ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition)、コールドスプリングハーバーラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory)、第1.53頁、1989年)に記載の方法などが挙げられる。また、ファージベクターにcDNAを組み込む方法としては、ヒュン (Hyunh) らの方法(DNAクローニング、プラクティカルアプローチ (DNA Cloning, a practical approach)、第1巻、第49頁、1985年)などが挙げられる。簡便には、市販のクローニングキット(例えば、宝酒造製等)を用いることもできる。このようにして得られる組換えプラスミドやファージベクターは、原核細胞(例えば、E. coli: XL1Blue MRF', DH5 $\alpha$ 、HB101またはMC1061/P3等)等の適当な宿主に導入する。

プラスミドを宿主に導入する方法としては、(モレキュラークローニング、ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition)、コールドスプリングハーバーラボラトリー (Cold Spring Harbor

Laboratory)、第1.74頁、1989年)に記載の塩化カルシウム法または塩化カルシウム/塩化ルビジウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。また、ファージベクターを宿主に導入する方法としてはファージDNAをインビトロパッケージングした後、増殖させた宿主に導入する方法等が例示される。インビトロパッケージングは、市販のインビトロパッケージングキット(例えば、ストラタジーン製、アマシャム製等)を用いることによって簡便に行うことができる。

上記の方法によって作製されたcDNAライブラリーから、本発明のポリペプチドをコードするcDNAを単離する方法は、一般的なcDNAスクリーニング法を組み合わせることによって行うことができる。

例えば、別個に本発明のポリペプチドのアミノ酸配列に対応すると考えられるオリゴヌクレオチドを化学合成したのち、これを $^{32}\text{P}$ でラベルしてプローブとなし、公知のコロニーハイブリダイゼーション法(クランシュタイン(Crunstein)ら、プロシーディングスオブナショナルアカデミーオブサイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、第72巻、第3961頁、1975年)またはブラークハイブリダイゼーション法(Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory、第2.108頁、1989年)により、目的のcDNAを含有するクローンをスクリーニングする方法、PCRプライマーを作製し本発明のポリペプチドの特定領域をPCR法により増幅し、該領域をコードするDNA断片を有するクローンを選択する方法等が挙げられる。

また、cDNAを発現しうるベクター(例えば、 $\lambda$ ZAPIIファージベクター)を用いて作製したcDNAライブラリーを用いる場合には、本発明のポリペプチドに反応性を有する抗体を用いる抗原抗体反応を利用して、目的のクローンを選択することができる。大量にクローンを処理する場合には、PCR法を利用したスクリーニング法を用いることが好ましい。

この様にして得られたDNAの塩基配列はマキシム・ギルバート法(マキシム



(Maxam) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、第74巻、第560頁、1977年)あるいはファージM13を用いたジデオキシヌクレオチド合成鎖停止の方法(サンガー (Sanger) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、第74巻、第5463～5467頁、1977年)によって決定することができる。本発明のポリペプチドをコードする遺伝子は、その全部または一部を上記のようにして得られるクローンから制限酵素等により切り出すことにより取得できる。

(2) また、前述のような本発明のポリペプチドを発現する細胞に由来するゲノムDNAから本発明のポリペプチドをコードするDNAを単離することによる調製方法としては、例えば以下の方法が例示される。

該細胞を好ましくはSDSまたはプロテナーゼK等を用いて溶解し、フェノールによる抽出を反復してDNAの脱蛋白質を行う。RNAを好ましくはリボヌクレアーゼにより消化する。得られるDNAを適当な制限酵素により部分消化し、得られるDNA断片を適当なファージまたはコスミドで増幅しライブラリーを作成する。そして目的の配列を有するクローンを、例えば放射性標識されたDNAプローブを用いる方法等により検出し、該クローンから本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の全部または一部を制限酵素等により切り出し取得する。

ヒト由来のポリペプチドをコードするcDNAを取得する場合には、さらにヒトゲノムDNA(染色体DNA)が導入されたコスミドライブラリーを作製(「ラボマニユアルヒトゲノムマッピング」、丸善出版)し、該コスミドライブラリーをスクリーニングすることにより、目的タンパクのコーディング領域のDNAを含む陽性クローンを得、該陽性クローンから切り出したコーディングDNAをプローブとして用い、前述のcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより調製することもできる。

(3) また、化学的合成による本発明のDNAの製造は、配列番号1、3、4、5または6に記載される塩基配列をもとにして、常法に従って行うことができる。

さらに本発明は、上述の本発明の細胞表面分子(ポリペプチド)をコードする

DNAを含有する組換えベクターに関する。本発明の組換えベクターとしては、原核細胞及び／または真核細胞の各種の宿主内で複製保持または自己増殖できるものであれば特に制限されず、プラスミドベクターおよびファージベクターが含まれる。

当該組換えベクターは、簡便には当業界において入手可能な組換え用ベクター（プラスミドDNAおよびバクテリアファージDNA）に本発明のポリペプチドをコードするDNAを常法により連結することによって調製することができる。用いられる組換え用ベクターとして具体的には、大腸菌由来のプラスミドとして例えばpBR322、pBR325、pUC12、pUC13、pUC19など、酵母由来プラスミドとして例えばpSH19、pSH15など、枯草菌由来プラスミドとして例えばpUB110、pTP5、pC194などが例示される。また、ファージとしては、λファージなどのバクテリオファージが、さらにレトロウイルス、ワクシニヤウイルス、核多角体ウイルスなどの動物や昆虫のウイルス（pVL1393、インビトロゲン製）が例示される。

本発明のポリペプチドをコードするDNAを発現させ本発明のポリペプチドを生産させる目的においては、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、原核細胞および／または真核細胞の各種の宿主細胞中で本発明のポリペプチドをコードする遺伝子を発現し、これら蛋白質を生産する機能を有するものであれば特に制限されない。例えば、pEFneo (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 158-162, 1994)、pEF-BOS (Nucleic Acid Research, 18, 5322, 1990)、pME18S（実験医学別冊「遺伝子工学ハンドブック」、1992年等）あるいはpMAL C2等を挙げることができる。

宿主細胞として細菌、特に大腸菌を用いる場合、一般に発現ベクターは少なくともプロモーター／オペレーター領域、開始コドン、本発明のポリペプチドをコードするDNA、終止コドン、ターミネーター領域および複製可能単位から構成される。

宿主として酵母、動物細胞または昆虫細胞を用いる場合、発現ベクターは少な

くともプロモーター、開始コドン、本発明のポリペプチドをコードするDNA、終止コドンを含んでいることが好ましい。またシグナルペプチドをコードするDNA、エンハンサー配列、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の5'側および3'側の非翻訳領域、スプライシング接合部、ポリアデニレーション部位、選択マーカー領域または複製可能単位などを含んでいてもよい。また、目的に応じて通常用いられる遺伝子増幅遺伝子（マーカー）を含んでいてもよい。

細菌中で本発明のポリペプチドを発現させるためのプロモーター／オペレーター領域は、プロモーター、オペレーターおよび Shine-Dalgarno(SD) 配列（例えば、AAGGなど）を含むものである。例えば宿主がエシェリキア属菌の場合、好適にはTrpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 $\lambda$  PLプロモーター、lppプロモーター、tacプロモーターなどを含むものが例示される。酵母中で本発明のポリペプチドを発現させるためのプロモーターとしては、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターが挙げられ、宿主がバチルス属菌の場合は、SL01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーターなどが挙げられる。また、宿主が哺乳動物細胞等の真核細胞である場合、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーター、EFプロモーターなどが挙げられる。好ましくは、SV-40、SR $\alpha$ 、レトロウイルスである。しかし、特にこれらに限定されるものではない。また、発現にはエンハンサーの利用も効果的な方法である。

好適な開始コドンとしては、メチオニンコドン（ATG）が例示される。

終止コドンとしては、常用の終止コドン（例えば、TAG、TGA、TAAなど）が例示される。

ターミネーター領域としては、通常用いられる天然または合成のターミネーターを用いることができる。

複製可能単位とは、宿主細胞中でその全DNA配列を複製することができる能

力をもつDNAを言い、天然のプラスミド、人工的に修飾されたプラスミド（天然のプラスミドから調製されたDNAフラグメント）および合成プラスミド等が含まれる。好適なプラスミドとしては、E. coli ではプラスミドpBR322、もしくはその人工的修飾物（pBR322を適当な制限酵素で処理して得られるDNAフラグメント）が、酵母では酵母2 $\mu$ プラスミド、もしくは酵母染色体DNAが、また哺乳動物細胞ではプラスミドpEFneo、pME18S、pRSVneo ATCC 37198、プラスミドpSV2dhfr ATCC 37145、プラスミドpdBPV-MMTneo ATCC 37224、プラスミドpSV2neo ATCC 37149等があげられる。

エンハンサー配列、ポリアデニレーション部位およびスプライシング接合部位については、例えばそれぞれSV40に由来するもの等、当業者において通常使用されるものを用いることができる。

選択マーカーとしては、通常使用されるものを常法により用いることができる。例えばテトラサイクリン、ネオマイシン、アンピシリン、またはカナマイシン等の抗生物質耐性遺伝子等あるいはチミジンキナーゼ遺伝子が例示される。

遺伝子増幅遺伝子としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、グルタミン酸合成酵素遺伝子、アデノシンデアミナーゼ遺伝子、オルニチンデカルボキシラーゼ遺伝子、ヒグロマイシン-B-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子、アスパルラートトランスカルバミラーゼ遺伝子等を例示することができる。

本発明の発現ベクターは、少なくとも、上述のプロモーター、開始コドン、本発明のポリペプチドをコードするDNA（遺伝子）、終止コドンおよびターミネーター領域を連続的かつ環状に適当な複製可能単位に連結することによって調製することができる。またこの際、所望により制限酵素での消化やT4DNAリガーゼを用いるライゲーション等の常法により適当なDNAフラグメント（例えば、リンカー、他のリストラクションサイトなど）を用いることができる。

本発明の形質転換細胞は、上述の発現ベクターを宿主細胞に導入することによ

り調製することができる。

本発明で用いられる宿主細胞としては、前記の発現ベクターに適合し、形質転換されうるものであれば特に限定されず、本発明の技術分野において通常使用される天然細胞あるいは人工的に樹立された組換細胞など種々の細胞（例えば、細菌（エシェリキア属菌、バチルス属菌）、酵母（サッカロマイセス属、ピキア属など）、動物細胞または昆虫細胞など）が例示される。

好ましくは大腸菌あるいは動物細胞であり、具体的には大腸菌（DH5 $\alpha$ 、XL1Blue MRF<sup>+</sup>、TB1、HB101等）、マウス由来細胞（COP、L、C127、Sp2/0、NS-1またはNIH3T3等）、ラット由来細胞、ハムスター由来細胞（BHK、CHO-K1およびCHO等）、サル由来細胞（COS1、COS3、COS7、CV1およびVelo等）およびヒト由来細胞（HEK293、Hela、2倍体線維芽細胞に由来する細胞、ミエローマ細胞およびNamalwa等）などが例示される。

発現ベクターの宿主細胞への導入（形質転換（形質移入））は従来公知の方法を用いて行うことができる。

例えば、細菌（E.coli、Bacillus subtilis 等）の場合は、例えばCohenらの方法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、第69巻、第2110頁、1972年）、プロトプラスト法（Mol. Gen. Genet.、第168巻、第111頁、1979年）やコンピテント法（ジャーナルオブモレキュラーバイオロジー（J. Mol. Biol.）、第56巻、第209頁、1971年）によって、Saccharomyces cerevisiaeの場合は、例えばハイネン（Hinnen）らの方法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、第75巻、第1927頁、1978年）やリチウム法（J. Bacteriol.、第153巻、第163頁、1983年）によって、動物細胞の場合は、例えばグラハム（Graham）の方法（バイロロジー（Virology）、第52巻、第456頁、1973年）、昆虫細胞の場合は、例えばサマーズ（Summers）らの方法（Mol. Cell. Biol.、第3巻、第2156～第2165頁、1983年）によってそれぞれ形

質転換することができる。

本発明のポリペプチドは、上記の如く調製される発現ベクターを含む形質転換細胞（以下、形質移入体を包含する意味で使用する。）を栄養培地で培養することによって製造することができる。

栄養培地は、宿主細胞（形質転換体）の生育に必要な炭素源、無機窒素源もしくは有機窒素源を含んでいることが好ましい。炭素源としては、例えばグルコース、デキストラン、可溶性デンプン、ショ糖などが、無機窒素源もしくは有機窒素源としては、例えばアンモニウム塩類、硝酸塩類、アミノ酸、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などが例示される。また所望により他の栄養素（例えば、無機塩（例えば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム）、ビタミン類、抗生物質（例えばテトラサイクリン、ネオマイシン、アンピシリン、カナマイシン等）など）を含んでいてもよい。

培養は当業界において知られている方法により行われる。培養条件、例えば温度、培地のpHおよび培養時間は、本発明のポリペプチドが大量に生産されるように適宜選択される。

なお、下記に宿主細胞に応じて用いられる具体的な培地および培養条件を例示するが、何らこれらに限定されるものではない。

宿主が細菌、放線菌、酵母、糸状菌である場合、例えば上記栄養源を含有する液体培地が適当である。好ましくは、pHが5～8である培地である。

宿主がE. coli の場合、好ましい培地としてLB培地、M9培地（ミラー（Miller）ら、Exp. Mol. Genet, Cold Spring Harbor Laboratory、第431頁、1972年）等が例示される。かかる場合、培養は、必要により通気、攪拌しながら、通常14～43℃、約3～24時間行うことができる。

宿主がBacillus属菌の場合、必要により通気、攪拌をしながら、通常30～40℃、約16～96時間行うことができる。

宿主が酵母である場合、培地として、例えばBurkholder最小培（ボスチアン（Bostian）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第77巻、第4505頁、1980年）が挙げられ、pHは5～8であることが望ましい。培養は通常約20～35℃で約14～144時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

宿主が動物細胞の場合、培地として例えば約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地（サイエンス（Science）、第122巻、第501頁、1952年）、DMEM培地（バイロロジー（Virology）、第8巻、第396頁、1959年）、RPMI 1640培地（J. Am. Med. Assoc.、第199巻、第519頁、1967年）、199培地（proc. Soc. Exp. Biol. Med.、第73巻、第1頁、1950年）等を用いることができる。培地のpHは約6～8であるのが好ましく、培養は通常約30～40℃で約15～72時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

宿主が昆虫細胞の場合、例えば胎児牛血清を含むGrace's 培地（Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第82巻、第8404頁、1985年）等が挙げられ、そのpHは約5～8であるのが好ましい。培養は通常約20～40℃で15～100時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

本発明のポリペプチドは、上述のような形質転換細胞、特に動物細胞を培養することにより、その細胞表面に目的分子を高発現させることが可能である。

一方、本発明のポリペプチドを、細胞外領域断片のような可溶性ポリペプチド断片として製造する場合には、当該細胞外領域あるいは各ドメインをコードするDNAを用いて上述のように形質転換体を調製し、外形質転換体を培養することにより培養上清中に分泌させることにより製造することができる。また、本発明の融合ポリペプチドについても同様にして作製することができる。

すなわち、得られた培養物を濾過または遠心分離等の方法で培養濾液（上清）を得、該培養濾液から天然または合成蛋白質を精製並びに単離するために一般に用いられる常法に従って該本発明のポリペプチドまたはポリペプチド断片を精製、

単離する。

単離、精製方法としては、例えば塩析、溶媒沈澱法等の溶解度を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過、ドデシル硫酸ナトリウムーポリアクリルアミドゲル電気泳動など分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーやヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーなどの荷電を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動などの等電点の差を利用する方法などが挙げられる。

一方、本発明のポリペプチドまたはポリペプチド断片が培養された形質転換体のペリプラズムまたは細胞質内に存在する場合は、培養物を濾過または遠心分離などの常法に付して菌体あるいは細胞を集め、適当な緩衝液に懸濁し、例えば超音波やリゾチーム及び凍結融解などの方法で細胞等の細胞壁および／または細胞膜を破壊した後、遠心分離やろ過などの方法で本発明のポリペプチドを含有する膜画分を得る。該膜画分をトライトン-X 100等の界面活性剤を用いて可溶化して粗溶液を得る。そして、当該粗溶液を先に例示したような常法を用いることにより、単離、精製することができる。

本発明における「トランスジェニックマウス」は、上述のような方法に従って調製できる本発明のマウス以外の動物種のポリペプチド（非自己のポリペプチド）をコードするDNA（cDNAまたはゲノミックDNA）がマウスの内在性遺伝子座上にインテグレート（integrate）されているトランスジェニックマウスであり、該トランスジェニックマウスは、体内に該非自己のポリペプチドを発現、分泌する。

該トランスジェニックマウスは、トランスジェニック動物の製造において通常使用されるような常法（例えば、最新動物細胞実験マニュアル、エル・アイ・シー発行、第7章、第361～第408頁、1990年を参照）に従って作製することが可能である。



具体的には、例えば、正常マウス胚盤胞 (blastocyst) のから取得した胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cell, ES Cell) を、例えば、ヒト由来の本発明のポリペプチド (即ち「ヒトJTT-1抗原」) をコードする遺伝子が発現可能なように挿入された発現ベクターで形質転換する。該本発明のヒト由来のポリペプチドをコードする遺伝子が内在性遺伝子上にインテグレートされたES細胞を常法により選別する。次いで、選別したES細胞を、別の正常マウスから取得した受精卵 (胚盤胞) にマイクロインジェクションする (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.77, No.12, pp.7380-7384, 1980; 米国特許第4,873,191号公報)。該胚盤胞を仮親としての別の正常マウスの子宮に移植する。そうして該仮親マウスから、ファウンダーマウス (子マウス) が生まれる。該ファウンダーマウスを正常マウスと交配させることによりヘテロトランスジェニックマウスを得る。該ヘテロ (heterogeneous) トランスジェニックマウス同士を交配することにより、メンデルの法則に従って、ホモ (homogeneous) トランスジェニックマウスが得られる。

本発明の「ノックアウトマウス」は、マウス由来の本発明のポリペプチド (即ち「マウスJTT-1抗原」) をコードする内在性遺伝子がノックアウト (不活性化) されたマウスであり、例えば相同組換えを応用したポジティブネガティブセレクション法を用いて作製することができる (米国特許第5,464,764号公報、同5,487,992号公報、同5,627,059号公報、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.86, 8932-8935, 1989、Nature, Vol.342, 435-438, 1989など)。

本発明における「抗体」とは、ポリクローナル抗体 (抗血清) あるいはモノクローナル抗体を意味し、好ましくはモノクローナル抗体である。

具体的には、前述の本発明のポリペプチドまたはポリペプチド断片に反応性を有する抗体である。

本発明の「抗体」は、本発明の「細胞表面分子」を発現する細胞 (天然の細胞、株化細胞、腫瘍細胞など)、遺伝子組換え技術を用いて作製される本発明のポリペプチドまたは細胞表面分子をその細胞表面に高発現させた形質転換体、あるいは

本発明の「ポリペプチド断片」若しくは「融合ポリペプチド」を抗原として、該抗原をマウス、ラット、ハムスター、モルモットあるいはウサギ等の哺乳動物に免疫して得られる天然型抗体、遺伝子組換技術を用いて製造され得るキメラ抗体及びヒト型抗体（CDR-grafted抗体）、並びにヒト抗体産生トランスジェニック動物等を用いて製造され得るヒト抗体も包含する。

またモノクローナル抗体の場合には、IgG、IgM、IgA、IgDあるいはIgE等のいずれのアイソタイプを有するモノクローナル抗体をも包含する。好ましくは、IgGまたはIgMである。

本発明で言うポリクローナル抗体（抗血清）あるいはモノクローナル抗体は、既存の一般的な製造方法によって製造することができる。即ち、例えば、前述のような抗原を、必要に応じてフロイントアジュバント（Freund's Adjuvant）とともに、哺乳動物、好ましくは、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、ヤギ、ウマあるいはウシ、より好ましくはマウス、ラット、ハムスター、モルモットまたはウサギに免疫する。

ポリクローナル抗体は、該免疫感作動物から得た血清から取得することができる。またモノクローナル抗体は、該免疫感作動物から得た該抗体産生細胞と自己抗体産生能のない骨髓腫系細胞（ミエローマ細胞）からハイブリドーマを調製し、該ハイブリドーマをクローン化し、哺乳動物の免疫に用いた抗原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を産生するクローンを選択することによって製造される。

モノクローナル抗体は、具体的には下記のようにして製造することができる。即ち、前述のような抗原を免疫原とし、該免疫原を、必要に応じてフロイントアジュバント（Freund's Adjuvant）とともに、非ヒト哺乳動物、具体的には、マウス、ラット、ハムスター、モルモットあるいはウサギ、好ましくはマウス、ラットあるいはハムスター（後述するヒト抗体産生トランスジェニックマウスのような他の動物由来の抗体を産生するように作出されたトランスジェニック動物

を含む)の皮下内、筋肉内、静脈内、フットパッド内あるいは腹腔内に1乃至数回注射するかあるいは移植することにより免疫感作を施す。通常、初回免疫から約1乃至14日毎に1乃至4回免疫を行って、最終免疫より約1乃至5日後に免疫感作された該哺乳動物から抗体産生細胞が取得される。免疫を施す回数及び時間的インターバルは、使用する免疫原の性質などにより、適宜変更することができる。モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの調製は、ケーラー及びミルシュタインらの方法(ネイチャー(Nature)、第256巻、第495～第497頁、1975年)及びそれに準じる修飾方法に従って行うことができる。即ち、前述の如く免疫感作された非ヒト哺乳動物から取得される脾臓、リンパ節、骨髓あるいは扁桃等、好ましくは脾臓に含まれる抗体産生細胞と、好ましくはマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギまたはヒト等の哺乳動物、より好ましくはマウス、ラットまたはヒト由来の自己抗体産生能のないミエローマ細胞との細胞融合させることにより調製される。

細胞融合に用いられるミエローマ細胞としては、例えばマウス由来ミエローマP3/X63-Ag8.653(653)、P3/NSI/1-Ag4-1(NS-1)、P3/X63-Ag8.U1(P3U1)、SP2/0-Ag14(Sp2/O、Sp2)、PA1、F0あるいはBW5147、ラット由来ミエローマ210RCY3-Ag.2.3.、ヒト由来ミエローマU-266AR1、GM1500-6TG-A1-2、UC729-6、CEM-AGR、D1R11あるいはCEM-T15を使用することができる。

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンのスクリーニングは、ハイブリドーマを、例えばマイクロタイタープレート中で培養し、増殖の見られたウェルの培養上清の前述の免疫感作で用いた免疫抗原に対する反応性を、例えばRIAやELISA等の酵素免疫測定法によって測定することにより行なうことができる。

ハイブリドーマからのモノクローナル抗体の製造は、ハイブリドーマをインビトロ、またはマウス、ラット、モルモット、ハムスターまたはウサギ等、好ましくはマウスまたはラット、より好ましくはマウスの腹水中等でのインビボで行い、

得られた培養上清、または哺乳動物の腹水から単離することにより行うことができる。

インビトロで培養する場合には、培養する細胞種の特性、試験研究の目的及び培養方法等の種々条件に合わせて、ハイブリドーマを増殖、維持及び保存させ、培養上清中にモノクローナル抗体を産生させるために用いられるような既知栄養培地あるいは既知の基本培地から誘導調製されるあらゆる栄養培地を用いて実施することが可能である。

基本培地としては、例えば、Ham' F12培地、MCDB153培地あるいは低カルシウムMEM培地等の低カルシウム培地及びMCDB104培地、MEM培地、D-MEM培地、RPMI1640培地、ASF104培地あるいはRD培地等の高カルシウム培地等が挙げられ、該基本培地は、目的に応じて、例えば血清、ホルモン、サイトカイン及び／または種々無機あるいは有機物質等を含有することができる。

モノクローナル抗体の単離、精製は、上述の培養上清あるいは腹水を、飽和硫酸アンモニウム、ユーグロブリン沈澱法、カプロイン酸法、カプリル酸法、イオン交換クロマトグラフィー（DEAEまたはDE52等）、抗イムノグロブリンカラムあるいはプロテインAカラム等のアフィニティカラムクロマトグラフィーに供すること等により行うことができる。

本発明のモノクローナル抗体としては、好ましくは下記のモノクローナル抗体が挙げられる。

（１）配列番号２に記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、該ポリペプチドに由来するポリペプチド断片または該ポリペプチドから構成されるヒト由来の細胞表面分子に反応性を有するモノクローナル抗体。

（２）本発明のポリペプチド、該ポリペプチドに由来するポリペプチド断片または該ポリペプチドにより構成される細胞表面分子に反応性を有するモノクローナル抗体であって、該モノクローナル抗体のマイトジェン（mitogen）で刺激した

リンパ芽球細胞への作用が、国際寄託番号FERM BP-5707で識別されるハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体がマイトジェンで刺激したラットリンパ芽球細胞に示す作用と実質的に同一であるモノクローナル抗体。

(3) 本発明のポリペプチド、該ポリペプチドに由来するポリペプチド断片または該ポリペプチドにより構成される細胞表面分子に反応性を有するモノクローナル抗体であって、該モノクローナル抗体のマイトジェン (mitogen) で刺激したリンパ芽球細胞への作用が、国際寄託番号FERM BP-5708で識別されるハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体がマイトジェンで刺激したラットリンパ芽球細胞に示す作用と実質的に同一であるモノクローナル抗体。

また、本発明のモノクローナル抗体には、国際寄託番号 FERM BP-5707及び FERM BP-5708で各々識別されるのハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体も包含する。

本発明における「キメラモノクローナル抗体」は、遺伝子工学的に作製されるモノクローナル抗体であって、具体的には、その可変領域が、非ヒト哺乳動物（マウス、ラット、ハムスターなど）のイムノグロブリン由来の可変領域であり、かつその定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするマウス／ヒトキメラモノクローナル抗体等のキメラモノクローナル抗体を意味する。

ヒトイムノグロブリン由来の定常領域は、I g G (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)、I g M、I g A、I g D及びI g E等のアイソタイプにより各々固有のアミノ酸配列を有するが、本発明における組換えキメラモノクローナル抗体の定常領域はいずれのアイソタイプに属するヒトイムノグロブリンの定常領域であってもよい。好ましくは、ヒト I g G の定常領域である。

本発明におけるキメラモノクローナル抗体は、例えば以下のようにして製造することができる。しかしながら、そのような製造方法に限定されるものでないことは言うまでもない。

例えば、マウス／ヒトキメラモノクローナル抗体は、実験医学（臨時増刊号）、第1．6巻、第10号、1988年及び特公平3-73280号公報等を参照しながら作製することができる。即ち、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから単離した該マウスモノクローナル抗体をコードするDNAから取得した活性なVH遺伝子（H鎖可変領域をコードする再配列されたVDJ遺伝子）の下流に、ヒトイムノグロムリンをコードするDNAから取得したCH遺伝子（H鎖定常領域をコードするC遺伝子）を、また該ハイブリドーマから単離したマウスモノクローナル抗体をコードするDNAから取得した活性なVL遺伝子（L鎖可変領域をコードする再配列されたVJ遺伝子）の下流にヒトイムノグロムリンをコードするDNAから取得したCL遺伝子（L鎖定常領域をコードするC遺伝子）を、各々発現可能なように配列して1つ又は別々の発現ベクターに挿入し、該発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、該形質転換細胞を培養することにより作製することができる。

具体的には、まず、マウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマから常法によりDNAを抽出後、該DNAを適切な制限酵素（例えばEcoRI、HindIII等）を用いて消化し、電気泳動に付して（例えば0．7%アガロースゲル使用）サザンブロット法を行う。泳動したゲルを例えばエチジウムブロマイド等で染色し、写真撮影後、マーカの位置を付し、ゲルを2回水洗し、0．25M HCl溶液に15分間浸す。次いで、0．4NのNaOH溶液に10分間浸し、その間緩やかに振盪する。常法により、フィルターに移し、4時間後フィルターを回収して2×SSCで2回洗浄する。フィルターを十分乾燥した後、ベイクン（75℃、3時間）を行う。ベイクン終了後に、該フィルターを0．1×SSC／0．1%SDS溶液に入れ、65℃で30分間処理する。次いで、3×SSC／0．1%SDS溶液に浸す。得られたフィルターをプレハイブリダイゼーション液と共にビニール袋に入れ、65℃で3～4時間処理する。

次に、この中に<sup>32</sup>P標識したプローブDNA及びハイブリダイゼーション液を

入れ、65℃で12時間程度反応させる。ハイブリダイゼーション終了後、適切な塩濃度、反応温度および時間（例えば、2×SSC-0.1%SDS溶液、室温、10分間）のもとで、フィルターを洗う。該フィルターをビニール袋に入れ、2×SSCを少量加え、密封し、オートラジオグラフィーを行う。

上記サザンブロット法により、マウスモノクローナル抗体のH鎖及びL鎖を各々コードする再配列されたVDJ遺伝子及びVJ遺伝子を同定する。同定したDNA断片を含む領域をショ糖密度勾配遠心にて分画し、ファージベクター（例えば、Charon 4A、Charon 28、λEMBL 3、λEMBL 4等）に組み込み、該ファージベクターで大腸菌（例えば、LE392、NM539等）を形質転換し、ゲノムライブラリーを作製する。そのゲノムライブラリーを適当なプローブ（H鎖J遺伝子、L鎖（κ）J遺伝子等）を用いて、例えばベントンディビス法（サイエンス(Science)、第196巻、第180～第182頁、1977年）に従って、ブラークハイブリダイゼーションを行い、再配列されたVDJ遺伝子あるいはVJ遺伝子を各々含むポジティブクローンを得る。得られたクローンの制限酵素地図を作製し、塩基配列を決定し、目的とする再配列されたVH(VDJ)遺伝子あるいはVL(VJ)遺伝子を含む遺伝子が得られていることを確認する。

一方、キメラ化に用いるヒトCH遺伝子及びヒトCL遺伝子を別に単離する。例えば、ヒトIgG1とのキメラ抗体を作製する場合には、CH遺伝子であるCγ1遺伝子とCL遺伝子であるCκ遺伝子を単離する。これらの遺伝子はマウス免疫グロブリン遺伝子とヒト免疫グロブリン遺伝子の塩基配列の高い相同性を利用してヒトCγ1遺伝子及びヒトCκ遺伝子に相当するマウスCγ1遺伝子及びマウスCκ遺伝子をプローブとして用い、ヒトゲノムライブラリーから単離することによって得ることができる。

具体的には、例えば、クローンIg146（プロシーディングスナショナルアカデミーオブサイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、第75巻、第4709～第4713頁、1978年）からの3kbのHindIII-BamHI断片と

クローンMEP10 (プロシーディングスナショナルアカデミーオブサイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、第78巻、第474～第478頁、1981年) からの6.8 kbのEcoRI断片をプローブとして用い、ヒトのラムダCharon 4AのHaeIII-AluIゲノムライブラリー (セル(Cell)、第15巻、第1157～第1174頁、1978年) 中から、ヒトC $\kappa$ 遺伝子を含み、エンハンサー領域を保持しているDNA断片を単離する。また、ヒトC $\gamma$ 1遺伝子は、例えばヒト胎児肝細胞DNAをHindIIIで切断し、アガロースゲル電気泳動で分画した後、5.9 kbのバンドを $\lambda$ 788に挿入し、前記のプローブを用いて単離する。

このようにして単離されたマウスVH遺伝子とマウスVL遺伝子、及びヒトCH遺伝子とヒトCL遺伝子を用いて、プロモーター領域及びエンハンサー領域などを考慮しながらマウスVH遺伝子の下流にヒトCH遺伝子を、またマウスVL遺伝子の下流にヒトCL遺伝子を、適切な制限酵素及びDNAリガーゼを用いて、例えばpSV2gptあるいはpSV2neo等の発現ベクターに常法に従って組み込む。この際、マウスVH遺伝子/ヒトCH遺伝子とマウスVL遺伝子/ヒトCL遺伝子のキメラ遺伝子は、一つの発現ベクターに同時に配置されてもよいし、各々別個の発現ベクターに配置することもできる。

このようにして作製したキメラ遺伝子挿入発現ベクターを、例えばP3X63 $\cdot$ Ag8 $\cdot$ 653細胞あるいはSP210細胞といった、自らは抗体を産生していない骨髓腫細胞にプロトプラスト融合法、DEAE-デキストラン法、リン酸カルシウム法あるいは電気穿孔法等により導入する。形質転換細胞は、発現ベクターに導入された薬物耐性遺伝子に対応する薬物含有培地中での培養により選別し、目的とするキメラモノクローナル抗体産生細胞を取得する。

このようにして選別された抗体産生細胞の培養上清中から目的のキメラモノクローナル抗体を取得する。

本発明における「ヒト型モノクローナル抗体 (CDR-grafted抗体)」は、遺伝



子工学的に作製されるモノクローナル抗体であって、具体的には、その超可変領域の相補性決定領域の一部または全部が非ヒト哺乳動物（マウス、ラット、ハムスターなど）のモノクローナル抗体に由来する超可変領域の相補性決定領域であり、その可変領域の枠組領域がヒトイムノグロブリン由来の可変領域の枠組領域であり、かつその定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするヒト型モノクローナル抗体を意味する。

ここで、超可変領域の相補性決定領域とは、抗体の可変領域中の超可変領域に存在し、抗原と相補的に直接結合する部位である3つの領域（Complementarity-determining residue；CDR 1、CDR 2、CDR 3）を指し、また可変領域の枠組領域とは、該3つ相補性決定領域の前後に介在する比較的保存された4つの領域（Framework；FR 1、FR 2、FR 3、FR 4）を指す。

換言すれば、非ヒト哺乳動物由来のモノクローナル抗体の超可変領域の相補性決定領域の一部または全部以外の全ての領域が、ヒトイムノグロブリンの対応領域と置き代わったモノクローナル抗体を意味する。

ヒトイムノグロブリン由来の定常領域は、IgG（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）、IgM、IgA、IgD及びIgE等のアイソタイプにより各々固有のアミノ酸配列を有するが、本発明におけるヒト型モノクローナル抗体の定常領域はいずれのアイソタイプに属するヒトイムノグロブリンの定常領域であってもよい。好ましくは、ヒトIgGの定常領域である。また、ヒトイムノグロブリン由来の可変領域の枠組領域についても限定されるものではない。

本発明におけるヒト型モノクローナル抗体は、例えば以下のようにして製造することができる。しかしながら、そのような製造方法に限定されるものでないことは言うまでもない。

例えば、マウスモノクローナル抗体に由来する組換えヒト型モノクローナル抗体は、特表平4-506458号公報及び特開昭62-296890号公報等を参照して、遺伝子工学的に作製することができる。即ち、マウスモノクローナル抗

体を産生するハイブリドーマから、少なくとも1つのマウスH鎖CDR遺伝子と該マウスH鎖CDR遺伝子に対応する少なくとも1つのマウスL鎖CDR遺伝子を単離し、またヒトイムノグロブリン遺伝子から前記マウスH鎖CDRに対応するヒトH鎖CDR以外の全領域をコードするヒトH鎖遺伝子と、前マウスL鎖CDRに対応するヒトL鎖CDR以外の全領域をコードするヒトL鎖遺伝子を単離する。

単離した該マウスH鎖CDR遺伝子と該ヒトH鎖遺伝子を発現可能なように適当な発現ベクターに導入し、同様に該マウスL鎖CDR遺伝子と該ヒトL鎖遺伝子を発現可能なように適当なもう1つの発現ベクターに導入する。または、該マウスH鎖CDR遺伝子／ヒトH鎖遺伝子とマウスL鎖CDR遺伝子／ヒトL鎖遺伝子を同一の発現ベクターに発現可能なように導入することもできる。このようにして作製された発現ベクターで宿主細胞を形質転換することによりヒト型モノクローナル抗体産生形質転換細胞を得、該形質転換細胞を培養することにより培養上清中から目的のヒト型モノクローナル抗体を得る。

本発明における「ヒトモノクローナル抗体」とは、イムノグロブリンを構成するH鎖の可変領域及びH鎖の定常領域並びにL鎖の可変領域及びL鎖の定常領域を含む全ての領域がヒトイムノグロブリンをコードする遺伝子に由来するイムノグロブリンである。

ヒト抗体は、常法に従って、例えば、少なくともヒトイムノグロブリン遺伝子をマウス等のヒト以外の哺乳動物の遺伝子座中に組込むことにより作製されたトランスジェニック動物を、抗原で免疫感作することにより、前述したポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体の作製法と同様にして製造することができる。

例えば、ヒト抗体を産生するトランスジェニックマウスは、Nature Genetics, Vol.7, p.13-21, 1994; Nature Genetics, Vol.15, p.146-156, 1997; 特表平4-504365号公報; 特表平7-509137号公報; 日経サイエンス、6月号、第40～第

50頁、1995年；国際出願公開WO 94/25585号公報；Nature, Vol. 368, p.856-859, 1994；及び特表平6-500233号公報などに記載の方法に従って作製することができる。

また、昨今開発された技術であるトランスジェニックなウシやブタのミルク中からヒト由来タンパクを製造方法を適用することも可能である（日系サイエンス、1997年4月号、第78頁乃至84頁）。

本発明における「抗体の一部」とは、前述のようなモノクローナル抗体の一部の領域を意味し、具体的には $F(ab')_2$ 、 $Fab'$ 、 $Fab$ 、 $Fv$  (variable fragment of antibody)、 $sFv$ 、 $dsFv$  (disulphide stabilised  $Fv$ ) あるいは $dAb$  (single domain antibody) などを意味する（エキスパート・オピニオン・オン・テラピューティック・パテント(Exp. Opin. Ther. Patents), 第6巻, 第5号, 第441~456頁, 1996年）。

ここで、「 $F(ab')_2$ 」及び「 $Fab'$ 」とは、イムノグロブリン（モノクローナル抗体）を、蛋白分解酵素であるペプシンあるいはパパイン等で処理することにより製造され、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の前後で消化されて生成される抗体フラグメントを意味する。例えば、IgGをパパインで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の上流で切断されてVL（L鎖可変領域）とCL（L鎖定常領域）からなるL鎖、及びVH（H鎖可変領域）とCH $\gamma$ 1（H鎖定常領域中の $\gamma$ 1領域）とからなるH鎖フラグメントがC末端領域でジスルフィド結合により結合した相同な2つの抗体フラグメントを製造することができる。これら2つの相同な抗体フラグメントを各々 $Fab'$ という。またIgGをペプシンで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の下流で切断されて前記2つの $Fab'$ がヒンジ領域でつながったものよりやや大きい抗体フラグメントを製造することができる。この抗体フラグメントを $F(ab')_2$ という。

本発明の「医薬組成物」とは、前記で定義される本発明の「ポリペプチド」、

該ポリペプチドから構成される「ホモダイマー分子」、「ポリペプチド断片」または「融合ポリペプチド」、該融合ポリペプチドから構成される「ホモダイマー分子」、「抗体」または「抗体の一部」のいずれかと、薬学的に許容され得る担体とからなる医薬組成物である。

ここで「薬学的に許容され得る担体」とは、賦形剤、希釈剤、増量剤、崩壊剤、安定剤、保存剤、緩衝剤、乳化剤、芳香剤、着色剤、甘味剤、粘稠剤、矯味剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤等が挙げられる。そのような担体の一つ以上を用いることにより、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、注射剤、液剤、カプセル剤、トロー剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤あるいはシロップ剤等の形態の医薬組成物を調製することができる。これらの医薬組成物は、経口あるいは非経口的に投与することができる。非経口投与のためのその他の形態としては、一つまたはそれ以上の活性物質を含み、常法により処方される外用液剤、腸溶内投与のための坐剤およびベッサリーなどが含まれる。

投与量は、患者の年齢、性別、体重及び症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは該医薬組成物に含有される活性成分（前記ポリペプチドや抗体など）の種類などにより異なるが、通常成人一人当たり、一回につき $10\mu\text{g}$ から $1000\text{mg}$ （あるいは $10\mu\text{g}$ から $500\text{mg}$ ）の範囲で投与することができる。しかしながら、投与量は種々の条件により変動するため、上記投与量より少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を越える投与量が必要な場合もある。

とりわけ注射剤の場合には、例えば生理食塩水あるいは市販の注射用蒸留水等の非毒性の薬学的に許容され得る担体中に $0.1\mu\text{g}$ 抗体/ $\text{ml}$ 担体 $\sim 10\text{mg}$ 抗体/ $\text{ml}$ 担体の濃度となるように溶解または懸濁することにより製造することができる。このようにして製造された注射剤は、処置を必要とするヒト患者に対し、1回の投与において $1\text{kg}$ 体重あたり、 $1\mu\text{g}\sim 100\text{mg}$ の割合で、好ましくは $50\mu\text{g}\sim 50\text{mg}$ の割合で、1日あたり1回～数回投与することができる。投与の形態としては、静脈内注射、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射あるい

は腹腔内注射のような医療上適当な投与形態が例示できる。好ましくは静脈内注射である。

また、注射剤は、場合により、非水性の希釈剤（例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類など）、懸濁剤あるいは乳濁剤として調製することもできる。

そのような注射剤の無菌化は、バクテリア保留フィルターを通す濾過滅菌、殺菌剤の配合または照射により行うことができる。注射剤は、用時調製の形態として製造することができる。即ち、凍結乾燥法などによって無菌の固体組成物とし、使用前に無菌の注射用蒸留水または他の溶媒に溶解して使用することができる。

本発明の医薬組成物は、T細胞等のリンパ球の活性化並びに活性化リンパ球の機能制御の異常に起因する種々の自己免疫性疾患、アレルギー性疾患または炎症性疾患の治療及び予防に適用が可能である。該疾患としては慢性関節リウマチ、多発性硬化症、自己免疫性甲状腺炎、アレルギー性接触性皮膚炎、慢性炎症性皮膚疾患である扁平苔癬、全身性エリテマトーデス、インスリン依存性糖尿病及び乾癬などが挙げられる。

また、本発明の医薬組成物の種々疾患症状の治療効果については、常法に従って、既知の疾患モデル動物に投与することにより試験、検討することができる。

例えば、①ヒト全身性エリテマトーデス（SLE）のモデルである(NZB/NZW)F1マウス（Science, Vol.125, p.1225-1227, 1994）、②多発性硬化症（MS）としての実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）のモデル（J. Clin. Invest., Vol.95, p.2783-2789, 1995）、③インスリン依存性糖尿病（IDDM）モデルであるNOD（non-obese diabetes）マウス（J. Exp. Med., Vol.181, p.1145-1155, 1995）、④グッドパスチャー（Goodpasture）の腎炎モデルである腎糸球体基底膜免疫によるラット腎炎モデル（Eur. J. Immunol., Vol.24, No.6, p.1249-1254, 1994）、⑤ヒト慢性関節リウマチモデルであるDBA/1マウス（Eur. J. Immunol., Vol.26, p.2320-2328, 1996）を用いることが可能である。

### 図面の簡単な説明

図1は、「JTT.1抗体」により誘導されるFTL435細胞の細胞凝集の状態、並びに「JTT.2抗体」による該細胞凝集の阻害の状態を示す顕微鏡写真である。

分図(a)はいずれのハイブリドーマ上清も加えない場合の細胞の状態を示し、分図(b)は「JTT-1抗体」による細胞凝集の状態を示し、分図(c)は「JTT-1抗体」とともに「抗ICAM-1抗体」を加えた場合の細胞凝集の状態を示し、また分図(d)は「JTT-1抗体」とともに「JTT-2抗体」を加えて場合の細胞凝集の状態を示す。

図2は、「JTT.1抗体」により誘導されるFTL435細胞及びラット活性化リンパ芽球の細胞凝集の状態、並びに「JTT.2抗体」による該細胞凝集の阻害の状態を示す顕微鏡写真である。

分図(a)はいずれの抗体も加えない場合のFTL435細胞の細胞の状態を示し、分図(b)はPMAを加えた場合のFTL435細胞の細胞の状態を示し、分図(c)は「JTT-1抗体」を加えた場合のFTL435細胞の細胞の状態を示し、分図(d)は「JTT-1抗体」とともに抗LFA-1抗体を加えた場合のFTL435細胞の細胞の状態を示し、分図(e)は「JTT-1抗体」とともに抗CD18抗体を加えた場合のFTL435細胞の細胞の状態を示し、分図(f)は「JTT-1抗体」とともに抗ICAM-1抗体を加えた場合のFTL435細胞の細胞の状態を示し、分図(g)はいずれの抗体も加えない場合の活性化リンパ芽球の細胞の状態を示し、分図(h)はPMAを加えた場合の活性化リンパ芽球の細胞の状態を示し、分図(i)は「JTT-1抗体」を加えた場合の活性化リンパ芽球の細胞の状態を示し、分図(j)は「JTT-1抗体」とともに抗LFA-1抗体を加えた場合の活性化リンパ芽球の細胞の状態を示し、分図(k)は「JTT-1抗体」とともに抗CD18抗体を加えた場合の活性化リンパ芽球の細胞の状態を示し、また分図(l)は「JTT-1抗体」とともに抗ICAM-1抗体を加えた場合の活性化リンパ芽球の細胞の状態を示す。

図3は、フローサイトメーターを用いて測定した各種細胞における「JTT.1抗原」及び「JTT.2抗原」の発現の状態を示す図である。

図4は、フローサイトメーターを用いて測定した各種リンパ球系細胞における「JTT.1抗原」の発現の状態を示す図である。

図5は、SDS-PAGEによる電気泳動により解析した「JTT.1抗原」の電気泳動像を示す写真である。

図6は、「JTT.1抗体」の共存下で誘導される精製「JTT.1抗原」をコートしたマイクロプレートへのラット胸腺細胞の接着の状態、並びに「JTT.2抗体」による該細胞接着の阻害の状態を示す顕微鏡写真である。

分図(a)は「JTT-1抗原」をコーティングしていないプレートへの細胞の接着の状態を示し、分図(b)はいずれの抗体も加えない場合の「JTT-1抗原」をコーティングしたプレートへの細胞の接着の状態を示し、分図(c)は「JTT-1抗体」のFab断片を加えた場合の「JTT-1抗原」をコーティングしたプレートへの細胞の接着の状態を示し、また分図(d)は「JTT-1抗体」のFab断片とともに「JTT-2抗体」を加えた場合の「JTT-1抗原」をコーティングしたプレートへの細胞の接着の状態を示す。

図7は、精製「JTT.1抗原」をコーティングしたプレートに接着した胸腺細胞の蛍光強度に基づく相対細胞数を示す図である。

「Ag(-)」は「JTT-1抗原」をコーティングしていないプレートにおける相対細胞数を示し、「Ag(+)」はいずれの抗体も加えない場合の「JTT-1抗原」をコーティングしたプレートにおける相対細胞数を示し、「Ag(+) + JTT.1 Fab」は「JTT-1抗体」のFab断片を加えた場合の「JTT-1抗原」をコーティングしたプレートにおける相対細胞数を示し、また「Ag(+) + JTT.1 Fab + JTT.2」は「JTT-1抗体」のFab断片とともに「JTT-2抗体」を加えた場合の「JTT-1抗原」をコーティングしたプレートにおける相対細胞数を示す。

図8は、フローサイトメーターを用いて測定した「ラットJTT-1抗原」をコード

するcDNAで形質転換したCOS細胞での「ラットJTT-1抗原」及び「ラットJTT-2抗原」の発現状態を示す図である。

図9は、ハイドロパシープロット解析による「JTT.1抗原」のアミノ酸配列の構造的特徴を示す図である。

図10は、ヒト、ラット、及びマウスの「JTT.1抗原」並びに「ラットJTT-1抗原」の変異体の各々のアミノ酸配列の相同性を示す図である。

図11は、「ヒトJTT-1抗原」、「ヒトCD28分子」及び「ヒトCTLA-4分子」のアミノ酸配列におけるアミノ酸配列相同性並びにモチーフの保存状態を示す図である。

図12は、「ヒトJTT-1抗原」、「ヒトCD28分子」及び「ヒトCTLA-4分子」の蛋白二次構造及びその類似性を模式的に示す図である。

図13は、「マウスJTT-1抗原」をコードするゲノミックDNAの構造を模式的に示す図である。

図14は、「ラットJTT-1抗原」及びそのオールタナティブスプライシング変異体の各々のアミノ酸配列の差異を示す図である。

図15は、 $[^3\text{H}]$ チミジン取込み試験により測定した「ヒトJTT-1抗原」に対するモノクローナル抗体により誘導されるヒト末梢血リンパ球の増殖の程度を示す図である。

縦軸は、細胞内への $[^3\text{H}]$ チミジンの取込み量(dpm)を示す。

図16は、疾患モデルラットにおける実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)の「JTT-1抗原」に対するモノクローナル抗体による治療効果を示す図である。

縦軸はスコア化した疾患症状の程度を示し、また横軸はEAE誘導のための免疫感作後の経過日数を示す。

図17は、疾患モデルラットにおける糸球体腎炎の「JTT-1抗原」に対するモノクローナル抗体による治療効果を示す図である。

縦軸は尿中蛋白排泄量を示し、また横軸は糸球体腎炎誘導のための免疫感作後



の経過時間（週）を示す。

図18は、プロテインAセファロースカラムによる「ラットJTT-1抗原」の細胞外領域とヒトIgFcとの融合ポリペプチド（rJTT-1-IgFc）の精製におけるカラムヒストグラムを示す図である。

図19は、SDS-PAGEによる電気泳動により解析したrJTT-1-IgFcの電気泳動像を示す写真である。

図20は、プロテインAセファロースカラムによる「ヒトJTT-1抗原」の細胞外領域とヒトIgFc（hJTT-1-IgFc）との融合ポリペプチドの精製におけるカラムヒストグラムを示す図である。

図21は、SDS-PAGEによる電気泳動により解析したhJTT-1-IgFcの電気泳動像を示す写真である。

図22は、「ラットJTT-1抗原」をコードするcDNAを導入したトランスジェニックマウス作製のための遺伝子導入用ベクターの構造を模式的に示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

##### [実施例1] モノクローナル抗体の調製

以下に述べる抗体産生ハイブリドーマの調製は、ケーラー（Kohler）らの方法（Blood、第81巻、101-111ページ、1993年、大森ら）を参照しながら行い、また、モノクローナル抗体の調製は神奈木らの方法（Handbook of Experimental Immunology、第4巻、117.21-117.21ページ、1986年）を参照しながら行った。

まず、ラット胸腺腫細胞株FTL435細胞を免疫感作抗原として、該抗原をBALB/cマウスに0日目（ $10^7$ 細胞/匹）、7日目、14日目および28日目という間隔及び量でフットパッド投与した。初回免疫のみ該抗原をフロイント完全アジュバントと混和したものを投与した。最後の免疫感作から2日後に該マウスのリンパ節を採取し、

常法によりマウスミエローマ細胞PAI (JCR No.B0113; Res. Disclosure, Vol.21 7, p.155, 1982, Stocker, J.W. et al. ) と融合させ、多数のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを得た。

〔実施例2〕 ハイブリドーマのスクリーニング及びモノクローナル抗体の性状解析

実施例1で調製した各種ハイブリドーマの培養上清中に生成されたモノクローナル抗体の免疫原であるFTL435細胞におよぼす効果を解析することによりハイブリドーマをスクリーニングした。96穴マイクロタイタープレートの各ウエルにFTL435細胞 ( $5 \times 10^6$  cell/mlを0.1ml) を播種し、各ハイブリドーマの培養上清 (それぞれ10  $\mu$ g/ml) を加え、37°Cで1時間培養した。その内のハイブリドーマクローン「JTT-1」及びクローン「JTT-2」についての結果を図1及び図2に示す。

ハイブリドーマクローン「JTT-1」が産生するモノクローナル抗体 (「JTT-1抗体」) は、FTL435細胞を強く凝集させる作用を持つことが確認された (図1(b)、及び図2(c))。一方、「JTT-1抗体」とともに「JTT-2抗体」を加えることにより、「JTT-1抗体」刺激によるFTL435細胞の凝集が強く抑制されることが確認された (図1(d))。なお、いずれのハイブリドーマ上清も加えない系を対照とした (図1(a)及び図2(a))。

この「JTT-1抗体」刺激によるFTL435細胞の凝集が、代表的な既知の接着分子経路であるICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1) とLFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen-1) の間の細胞接着によるものか否かを確認するため、「JTT-1抗体」とともに抗ラットICAM-1抗体1A29 (10  $\mu$ g/ml ; IgG1) または抗ラットLFA-1抗体 (10  $\mu$ g/ml ; IgG2a) を加えて37°Cで1時間培養した。

「JTT-1抗体」刺激によるFTL435細胞の凝集は、抗ICAM-1抗体及び抗LFA-1抗体のいずれによっても抑制されなかった (〔抗ICAM-1抗体〕 : 図1(c)及び図2(f)、及び〔抗LFA-1抗体〕 : 図2(d))。

「JTT-1抗体」の細胞凝集能に関するさらなる性状解析のために、コンカナバリ

ンAで刺激して活性化したラット活性化リンバ芽球細胞に対する凝集能を前述と同様にして解析した。結果を図2に示す。

FTL435細胞に対する作用と同様に、「JTT-1抗体」の刺激により活性化リンバ芽球細胞の凝集が誘導された(図2(i))。しかしながら、活性化リンバ芽球細胞に対しては、「JTT-1抗体」刺激による細胞凝集の多くは、抗LFA-1抗体(図2(j))および抗ICAM-1抗体(図2(l))により抑制された(但し、部分的凝集が残った)。

対照であるいずれの抗体も加えない系(図2(g))から明らかなように、活性化リンバ芽球等の活性化リンバ球は、PMA (Phorbol myristate acetate : LFA-1を活性化させる機能を有する)(図2(h))や「JTT-1抗体」(図2(i))による刺激を受けない限り何らの細胞接着による凝集は起こらない。従って、抗LFA-1抗体により「JTT-1抗体」刺激による細胞凝集の部分的に抑制された事実は、活性化リンバ芽球細胞においては、「JTT-1抗体」の刺激によりLFA-1が活性化されていることを示すものである。これは、「JTT-1抗体」により認識される分子が何らかのシグナルの伝達に関与する機能を有していることを示すものである。

なお、ハイブリドーマクローン「JTT-1」及び「JTT-2」は、1996年10月11日付でブダペスト条約の下で認定された国際寄託機関である日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号所在の日本国通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に国際寄託した(「JTT-1」: 国際寄託番号FERM BP-5707、「JTT-2」: 国際寄託番号FERM BP-5708)。

マウスモノクローナル抗体アイソタイプ同定キット(Amersham社製)を用いた解析により、各々のハイブリドーマから産生させるモノクローナル抗体(JTT-1抗体及びJTT-2抗体)のアイソタイプはともにIgG1と決定された。

【実施例3】 「JTT.1抗体」及び「JTT.2抗体」の各種細胞に対する反応性  
各種細胞における「JTT.1抗体」及び「JTT.2抗体」の認識する分子の発現パターンを解析する目的で、各種細胞に対する該抗体の反応性を確認した。なお、「JTT-1抗体」が認識する分子を「JTT-1抗原」と、また「JTT-2抗体」が認識する

分子を「JTT-2抗原」と命名する。

5乃至10週齢のウイスターラット（150乃至250g）をジエチルエーテルにて麻酔死させた。外科的手術により開腹して胸部及び腹部から各々胸腺及び脾臓を摘出し、すりつぶして細胞浮遊液を調製した。更に、脾臓細胞をコンカナバリンA（2  $\mu$ g/ml）及び10%FCSを含むRPMI1640培地中で37°Cで、3日間培養することにより、活性化リンパ芽球を調製した。

FTL435細胞、胸腺細胞、脾臓細胞及び活性化リンパ芽球（各 $5 \times 10^5$ 個）を「JTT.1抗体」または「JTT.2抗体」と反応させ、次いでFITC標識抗マウスIgG（Cappel社製）反応させた後、染色された細胞の蛍光強度をエビックスエリート（EPICS-Elite）フローサイトメーターを用いて測定した。

結果を図3に示す。FTL435細胞では、「JTT.1抗原」及び「JTT.2抗原」の強い発現がみられた。胸腺細胞でも同分子の発現がみられたが、脾臓細胞ではわずかにしか発現していなかった。しかし、脾臓細胞をコンカナバリンAで刺激して得た活性化リンパ芽球では、「JTT.1抗原」及び「JTT.2抗原」の強い発現がみられるようになった。また各々の細胞種において「JTT.1抗原」及び「JTT.2抗原」の発現パターンは、一致していた。この結果は「JTT-1抗原」及び「JTT-2抗原」が同一の分子であることを示唆するものである。

#### 【実施例4】 「JTT.1抗体」の種々リンパ系細胞に対する反応性

種々リンパ系細胞での「JTT.1抗体」の認識する分子（「JTT-1抗原」）の発現パターンを解析する目的で、2種類のラット（Wistarラット、及びF344ラット）のリンパ節、脾臓由来Tリンパ芽球、及び脾臓由来Bリンパ芽球に対する「JTT-1抗体」の反応性を解析した。

5乃至10週齢のWistarラット及びF344ラット（150乃至250g）をジエチルエーテルにて麻酔死させた。各々のラットを外科的手術により開腹してリンパ節及び脾臓を摘出し、すりつぶして細胞浮遊液を調製した。更に、脾臓の細胞調製物をコンカナバリンA（ConA；2  $\mu$ g/ml）及び10%FCSを含むRPMI1640培地中で37°Cで、3

日間培養した。各々のラットについて、1日間培養後及び3日間培養後に、活性化Tリンパ芽球、及び活性化Bリンパ芽球を取得した。また、対照として、リンパ節細胞およびConAを加える前（0日）に取得した脾臓由来Tリンパ芽球、及びBリンパ芽球を用いた。

各々の細胞（各 $5 \times 10^5$ 個）を、ビオチン標識抗ラットT細胞抗体またはビオチン標識抗ラットB細胞抗体（ $10 \mu\text{g/ml}$ 、生化学工業製）と反応させた後、ビコエリスリン標識ストレプトアビジンと反応させた。次いで、FITC標識した「JTT-1抗体」（ $10 \mu\text{g/ml}$ ）と反応させ、染色された細胞の蛍光強度をエピックスエリート（EPICS-Elite）フローサイトメーターを用いて測定した。

結果を図4に示す。Wistarラット及びF344ラットともに、活性化Tリンパ芽球、及び活性化Bリンパ芽球のいずれにおいてもConA刺激による活性化の1日目から「JTT.1抗原」の強い発現がみられた。また各々の細胞種における「JTT.1抗原」の発現パターンは、ほぼ一致していた。

【実施例5】 免疫沈降実験による「JTT.1抗原」及び「JTT.2抗原」の性状解析

「JTT.1抗原」及び「JTT.2抗原」の性状を解析する目的で、FTL435細胞を用いて免疫沈降実験を行った。

#### （1）ビオチン化可溶性細胞表面分子の調製

FTL435細胞をPBSで洗浄した後、 $100 \mu\text{g/ml}$ のNHS-ビオチンを含む $0.1\text{M}$ ヘプス含有生理食塩水（ $\text{pH}8.0$ ）に $1 \times 10^7$ 細胞/ $\text{ml}$ になるよう懸濁し、室温で40分間反応させた。細胞をPBSで3回洗浄した後、可溶化バッファー（ $1\%\text{NP-40}$ 、 $10\text{mM}$ Tris-HCl（ $\text{pH}7.4$ ）、 $0.15\text{M}$ NaCl）を $5 \times 10^7$  cells/ $\text{ml}$ になるように添加し、 $4^\circ\text{C}$ 、30分間反応させ細胞を溶解した。得られた細胞溶解物を遠心し、ビオチン化可溶性細胞表面分子を含む遠心上清を $-80^\circ\text{C}$ で保存した。

#### （2）免疫沈降及びSDS-PAGE解析

実施例1で調製したハイブリドーマクローン「JTT-1」の培養上清から常法によ

り精製した「JTT.1抗体」の精製標品を、2mg/mlになるようにプロテインG-セファロースビーズと混合し、4°Cで1時間反応させビーズに抗体を結合させた。ビーズを洗浄し、10 $\mu$ lのビーズに対しビオチン化FTL435細胞可溶化物を500 $\mu$ l添加し、4°Cで2時間反応させた。ビーズを可溶化バッファーで3回洗浄し、50 $\mu$ lのグリカナナーゼバッファー（0.15%SDS含有ナトリウムリン酸バッファー(pH7.0)）を加え煮沸することにより抗体結合ビーズにトラップされた結合分子を溶出させた。溶出サンプルの一部に1.25%NP-40とN-グリカナナーゼ（20U/ml）を添加し一晚反応させ、N型糖鎖を消化した。

溶出サンプル5 $\mu$ lに2-メルカプトエタノール存在下あるいは非存在下でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）用サンプルバッファー（Enprotech社製）を等量添加して煮沸し、電気泳動後、PVDF膜に転写した。転写膜を3% BSA-PBS でブロッキングを行い、次いでペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと反応させた後、使用説明書の記載に従いECLシステム（Amersham社製）を用いて「JTT-1抗体」によりトラップされたビオチン化可溶性細胞膜表面分子を検出した。

図5に結果を示す。「JTT.1抗体」により認識されるFTL435細胞上の分子（「JTT-1抗原」）は、非還元下（図5中に「(-)」で示した）で約47kDの分子量を有し、また還元下（図5中に「(+)」で示した）で約24kDおよび約28kDの分子量を有していた。またN型糖鎖を消化を行うことにより（図5中に「+N-gly」で示した）、「JTT.1抗原」は、非還元下で約36kD、また還元下で約20kDの1本のバンドに収束した。以上の結果から、「JTT.1抗原」は、糖鎖修飾が異なりコア蛋白が同一の分子からなるダイマーを形成していると推定された。なお、「JTT.2抗体」を用いて上述と同様にして行った試験においても全く同様の結果が得られた。この結果と実施例3及び後述の実施例7の結果を考え合わせると、「JTT.1抗原」（「JTT-1抗体」により認識される分子）及び「JTT.2抗原」（「JTT-2抗体」により認識される分子）は全く同一の分子であると考えられた。

〔実施例6〕 精製「JTT.1抗原」に対するラット胸腺細胞の接着実験並びにN

### 末端アミノ酸解析

「JTT.1抗体」が認識する分子（「JTT-1抗原」）が接着分子としての機能を有しているか否かを解析するため以下の実験を行った。また、N末端アミノ酸解析を行った。

#### （１）「JTT.1抗体」アフィニティーカラムの調製

実施例１で調製したハイブリドーマクローン「JTT-1」の培養上清から常法により精製した「JTT.1抗体」の精製標品2mg(2ml)を1mlのプロテインG-セファロース樹脂と混合し、4℃で１時間反応させた。樹脂を200mMのトリエタノールアミン（pH8.2）で３回洗浄した。さらに、10mMジメチルピメリミデート（DMP）を含むトリエタノールアミン（pH8.2）中で室温下１時間インキュベートすることにより、樹脂に「JTT.1抗体」を共有結合させた。

#### （２）「JTT.1抗原」の精製

FTL435細胞を10%FCS含有RPMI1640培地を用いて培養した。細胞を遠心操作により回収し、ペレットをPBSにて３回洗浄した。洗浄後のペレットに可溶化バッファ－（1%NP-40、10mMTris-HCl(pH7.4)、0.15MNaCl）を $5 \times 10^7$  cells/mlになるように添加し、4℃で30分間反応させ細胞を溶解した。得られた細胞溶解物を遠心し、可溶性細胞表面分子を含む遠心上清を-80℃で保存した。

可溶化物400mlを「JTT.1抗体」アフィニティーカラムに添加した。カラムを可溶化バッファ－50ml及びPBS20mlで洗浄した後、0.2Mグリシンバッファ－（pH2.8）で「JTT-1抗原」を溶出させた。溶出した「JTT-1抗原」に1Mトリスバッファ－を添加して中和した。得られた「JTT.1抗原」は、マイナス80℃で保存した。

#### （３）N末端のアミノ酸配列の決定

得られた精製「JTT-1抗原」を、SDS-PAGEで展開後、常法によりN末端のアミノ酸配列を決定し、Glu-Leu-Asn-Asp-Leu-Ala-Asn-His-Argのアミノ酸配列を含むことが明らかとなった。

#### （４）接着実験

5乃至10週齢のウイスターラット（150乃至250g）をジエチルエーテルにて麻酔死させた。外科的手術により胸部を開腹して胸腺を摘出し、すりつぶして胸腺細胞浮遊液を調製した。細胞浮遊液に、2',7'-ビス（カルボキシエチル）カルボキシフルオレインテトラセトキシメチルエステル（BCECF-AM; Molecular Probes社製）10 $\mu$ Mを添加し、37°Cで30分間培養することにより、蛍光標識を行った。細胞をPBSで洗浄した後、10%FCSを含むRPMI1640培地中に、 $2 \times 10^7$  cell/mlの濃度になるように再浮遊させた。

96穴ELISAプレートに、(2) で得た精製「JTT.1抗原」を10 $\mu$ l/wellで1晩コーティングした。プレートをPBSで洗浄した後、3%BSAを含むPBSを200 $\mu$ l/well添加し2時間ブロッキングを行った。プレートをPBSで洗浄した後、各ウェルに①蛍光標識胸腺細胞（ $2 \times 10^7$  cells/mlを0.1ml）のみ、②蛍光標識胸腺細胞（同濃度）及び常法により調製した「JTT.1抗体」のFab断片（5 $\mu$ g/ml）、並びに③蛍光標識胸腺細胞（同濃度）、該「JTT.1抗体」のFab断片（同濃度）及び「JTT.2抗体」（10 $\mu$ g/ml）を加え、37°Cで1時間培養した。結合していない細胞を除去するために、各ウェルを10%FCSを含むRPMI1640培地にて1回洗浄した。各ウェルを光学顕微鏡で観察した。次いで、各ウェルに0.1%NP-40溶液100 $\mu$ lを添加してプレートに結合している細胞を溶解した。フルオロスキャンIIマイクロプレート・フルオロメーター（Flow Laboratories社製）を用いて、538nm（485nmで励起）の波長での蛍光強度を測定することにより、各ウェルに結合した蛍光標識胸腺細胞の相対細胞数を計数した。なお、精製「JTT.1抗原」をコーティングしない系を対照とした。光学顕微鏡観察の結果を図6に示す。

胸腺細胞は、「JTT.1抗体」のFab断片存在下でのみ有意に精製「JTT.1抗原」に接着した（図6(c)）。またその接着は、「JTT.2抗体」により有意に阻害された（図6(d)）。

なお、各ウェルにコーティングした「JTT.1抗原」に接着した胸腺細胞の相対細胞数を蛍光強度により測定した結果を図7に示した。



以上の結果により、「JTT.1抗原」は、接着分子としての機能を有していることが確認された。

[実施例7] ラット「JTT.1抗原」をコードするcDNAのクローニング

1. cDNAライブラリーの作製

1- (1) ConA刺激ラットリンパ芽球からのpoly(A)+RNAの抽出

ConAで刺激したラット脾臓由来リンパ芽球 (Con A blast) (約 $1 \times 10^6$  cells/ml) を4℃で5分間 ( $2,000 \times g$ ) 遠心して、沈殿した細胞をISOGEN (ニッポンジーン社製) を用いて懸濁し、クロロホルムで浸とう抽出して上清を回収した。得られた上清にイソプロパノールを添加して室温で10分間放置した後、4℃で10分間、 $12,000 \times g$ にて遠心し、RNAを沈殿させた。沈殿したRNAをエタノールで洗浄した後、TE緩衝液に溶解した。得られた全RNAから、「mRNA Purification Kit」(Pharmacia社製)を用いてpoly(A)+RNAを精製した。

1- (2) cDNAの調製

調製したpoly(A)+RNA5 $\mu$ gを鋳型とし、「Time Saver cDNA Synthesis Kit」(Pharmacia社製)を用いてcDNAを合成した。スクリーニングの効率を上げるため、Not I切断部位を有する「oligo dTプライマー」(Pharmacia社製)を用いた。次いでEcoRIをアダプター付加し、NotI消化を行い、単一方向性を有するcDNAを得た。更にスパンカラム (Pharmacia社製) を用いてサイズ分画を行った。

1- (3) ベクターへの組み込み

得られたEcoRIおよびNotI末端を有するcDNAを、EcoRIおよびNotI処理したベクターpME18S (Hara, T. and Miyajima, A. EMBOJ., 11, 1875-1884, 1992) に連結した。連結反応には「DNA ligation Kit」(宝酒造社製)を用いた。得られた反応生成物を用いてE. coli DH5 (東洋紡社製) を形質転換した。形質転換体はO.D. 値 (600nm) が0.6になるまで培養した後集菌し、ライブラリーを含むプラスミドDNAを回収した。プラスミドDNAの精製にはQUIAGEN-Tip (QUIAGEN社製) を用いた。

2. cDNAライブラリーのスクリーニング

スクリーニング法はパニング法 (Seed, B. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 3365-3369, 1987) に準じて行った。

#### 2 - (1) COS細胞への遺伝子導入

得られたライブラリーをエレクトロポレーション法 (Potter, H. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 2288-2292) によりCOS7細胞に導入した。導入後60時間培し、上清を除去しPBSで3回洗浄した。次いでPBS (0.5mM EDTA) で処理 (37°C, 30分) した後ピペッティング操作により細胞を剥がした。さらに「Lymphprep」(NYCOMED社製)を用いて生細胞のみを回収した。

#### 2 - (2) パニングによる遺伝子発現細胞の濃縮

得られた生細胞をPBS (5%FCS, 0.5mM EDTA) に懸濁した。細胞懸濁液を「JTT. 1抗体」をコートした培養皿に移し、室温で3時間作用させた。培養皿への非結合細胞を除去し、培養皿をPBSで3回洗浄した後、培養皿に結合した細胞からHirt法 (Hirt, B. J. Mol. Biol., 26, 365-369) によりプラスミドDNAを回収した。得られたプラスミドDNAを用いてE. coli DH10B (GIEBCO BRL社製) を形質転換した。形質転換体を用いて前記1-(3)と同様にプラスミドDNAを増幅、精製した。得られたDNAを用いて、前記(1)及び本(2)に記載の操作を更に2回繰り返し行った。

#### 2 - (3) ポジティブクローンの単離

3回目のパニング後、形質転換したE. coli DH10Bをアンピシリン含有LB plateで終夜培養しコロニーを得た。薬剤耐性コロニー20個を培養しアルカリ・ミニプレップ法 (Maniatis, T. et al. Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) でプラスミドDNAを回収し挿入されたDNA (インサートDNA) を解析した。アガロースゲル電気泳動の結果、約0.9kbのcDNAを有するクローン (以下、このクローンを「T132A7」と称する) が濃縮されていることが明らかとなった。

前記(1)に記載の方法を用いて、「T132A7」を再びCOS7細胞で一過性に発現させた。「T132A7」導入細胞を、「JTT.1抗体」または「JTT.2抗体」と反応させ、次

いでFITC標識抗マウスIgG (Cappel社製) 反応させた後、染色された細胞の蛍光強度をEPICS-Eliteフローサイトメーター (Coulter社製) を用いて測定した。「JT T.1抗体」及び「JTT.2抗体」は「T132A7」遺伝子産物を強く認識していた。結果を図8に示す。

### 3. 塩基配列及びアミノ酸配列の決定

クローン「T132A7」の塩基配列を、ジデオキシ法により「Auto Read Sequencing Kit」 (Pharmacia社製) と「A.L.F.DNA sequencer」 (Pharmacia社製) を用いて決定した。また、該塩基配列がコードする「ラットJTT.1抗原」の推定アミノ酸配列を遺伝子解析ソフト「GENEWORKS」 (IntelliGenetics社製) を用いて解析した。該塩基配列及び推定アミノ酸配列を、配列番号4に記載する。

クローニングした遺伝子から演繹されるアミノ酸配列 (200アミノ酸残基から構成される) には、実施例6-(3)で決定したN末端アミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含んでいた。クローン「T132A7」導入細胞が、「JTT-1抗体」に強く反応することを考え合わせると、クローン「T132A7」は「ラットJTT.1抗原」をコードするcDNAを含んでいると結論できる。

### 4. コンピューター解析

「JTT.1抗原」の推定アミノ酸配列の一次構造について、KiteとDoolittleの方法 (Kite, J. &Doolittle, R. F. J. Mol. Biol. 157, 105-132, 1982) に従ってハイドロパシー・プロット解析を行った (図9)。その結果、「JTT.1抗原」はN末端にシグナル配列を有する細胞膜貫通蛋白質であることが明らかとなった。また、モチーフ解析の結果、「JTT.1抗原」の細胞外ドメインに2カ所のアスパラギン結合型糖鎖結合部位を有し、また細胞内ドメインに2カ所のカゼインキナーゼリン酸化部位並びに1カ所のプロテインキナーゼCリン酸化部位を有していることが明らかとなった。なお、図9中の「CHO」はN型糖鎖結合部位を示し、「P」はリン酸化部位を示し、「CKII」はカゼインキナーゼIIを示し、「PKC」はプロテインキナーゼCを示す。

## 〔実施例 8〕 「ヒト JTT.1 抗原」 cDNA のクローニング

### 1. プロープの作製

実施例 7 で得たクローン「T132A7」を制限酵素 EcoRI および NotI で消化して、「ラット JTT.1 抗原」をコードする cDNA 約 0.9kb を切り出し、アガロースゲル電気泳動により分離した。分離した DNA 断片を「QUIAEX gel extraction kit」(QUIA TEN 社製)を用いて精製し、得られた DNA 断片を「Ready-To-Go DNA labelling kit」(Pharmacia 社製)を用いて  $^{32}\text{P}$  で標識した。この標識 DNA 断片をブランクハイブリダイゼーション用のプロープとして用いた。

### 2. cDNA ライブラリーの作製

#### 2- (1) poly(A)+RNA の抽出

実施例 7-1-(1)と同様にして、ConA で刺激したヒト末梢血由来のリンパ芽球 (Con A blast) から poly(A)+RNA を抽出した。

#### 2- (2) cDNA の調製

調製した poly(A)+RNA 5  $\mu\text{g}$  を鋳型とし、「oligo dT プライマー」(Pharmacia 社製)と「Time Saver cDNA Synthesis Kit」(Pharmacia 社製)を用いて cDNA を合成した。次いで、EcoRI アダプターを付加した後、スパンカラム (Pharmacia 社製)を用いてサイズ分画を行った。

#### 2- (3) ベクターへの組み込み及びパッケージング

得られた EcoRI 末端を有する cDNA を、EcoRI で処理したベクター「 $\lambda$  ZAPII」(Stratagene 社製)に連結した。連結反応には「DNA ligation Kit」(宝酒造社製)を用いた。これを「GIGA PACK II GOLD」(Stratagene 社製)を用いてインビトロパッケージング (in vitro packaging) した後、得られたファージ粒子を用いて、E coli XL1Blue MRF' (Stratagene 社製)を宿主として組換えファージを含有するブランクからなる cDNA ライブラリーを作製した。

### 3. cDNA ライブラリーのスクリーニング

スクリーニングは「Rapid hybridization buffer」(Amersham 社製)を用いた

ブランクハイブリダイゼーション法 (Maniatis, T. et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) に従い行った。得られたcDNAライブラリー ( $1 \times 10^4$  個) を寒天プレートにまき、「Hybond-N nylon membrane」 (Amersham社製) を用いてレプリカを作製した。レプリカと前記実施例8-1で作製した $^{32}\text{P}$  標識プローブを用い、「Rapid hybridization buffer」 (Amersham社製) 中でブランクハイブリダイゼーションを行った。1次スクリーニング及び2次スクリーニングを行い、8個のポジティブ・クローンを得た。各クローンをシングルブランクで単離後、マニュアル (Stratagene社) に従ってインビボエキサイション (in vivo Excision) に供し、7つのポジティブクローンをプラスミドDNAとして回収した。

#### 4. 塩基配列決定

7個のクローンの塩基配列を、ジデオキシ法により、「Auto Read Sequencing Kit」 (Pharmacia社製) と「A.L.F. DNA sequencer」 (Pharmacia社製) を用いて決定した。7個のクローンはすべて同じ塩基配列を含んでいた。このうちクローン「pBSh41」は、「ヒトJTT-1抗原」の全長をコードしていることが確認された。「ヒトJTT-1抗原」の読取り枠 (open reading frame; ORF) に対応するcDNAの塩基配列を配列番号1に、また「ヒトJTT.1抗原」の推定全長アミノ酸配列を配列番号2、また5' 及び3' 配列を含む塩基配列を配列番号3 (ORFは、塩基番号26乃至625) に示す。該クローンに含まれる塩基配列が、「ヒトJTT-1抗原」の全長をコードするものであることは、該塩基配列から演繹されるアミノ酸配列 (199アミノ酸残基から構成される) が、「ラットJTT.1抗原」のアミノ酸配列と有意な相同性を示すことから明らかである (図10)。また、図10に示されるとおり、ヒト及びラットの「JTT.1抗原」のアミノ酸配列相同性は、60%以上である。

なお、クローン「pBSh41」により形質転換したE.coli.DH10B (GIBCO BRL社製) を、1996年10月25日付でブダペスト条約の下で認定された国際寄託機関である日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号所在の日本国通産省工業技術院生命工学技

術研究所に寄託した（寄託番号：FERM BP-5725）。

#### 5. 「JTT-1抗原」の構造的特徴及び生物学的機能

演繹される「ヒトJTT-1抗原」のアミノ酸配列について、既知ヒトタンパクとのモチーフ検索を行った結果、「ヒトJTT-1抗原」は、先に詳細に述べた免疫グロブリンスーパーファミリーに属するヒト由来の細胞膜分子である「CD28」及び「CTLA-4」と次の点で構造的類似性を有していることが確認された（図11及び図12）。前述したとおり、「CD28」及び「CTLA-4」は、T細胞の活性化及び抑制を制御する免疫系において極めて重要な分子である。

即ち、①システイン残基を含む20以上のアミノ酸残基が良く保存されている。②：CD28及びCTLA-4におけるリガンド結合領域として必須なプロリン残基の連続する配列「Pro-Pro-Pro (PPP)」が保存されている。また、③：細胞内ドメインに、CD28及びCTLA-4におけるシグナル伝達領域として必須な配列「Tyr-Xaa-Xaa-Met (YxxM) (Xaa及びxは任意のアミノ酸を意味する。）」が保存されている。

本発明の「JTT-1抗原」は、そのような免疫反応の主役であるT細胞の活性化の制御において重要な役割を担う「CD28」及び「CTLA-4」に特徴的な構造と同一の構造を有することから、本発明の「JTT-1抗原」は、それらの分子と同様に免疫反応の主体であるT細胞をはじめとしたリンパ球の活性化の制御において重要な役割も果たす分子であることが推測される

#### 〔実施例9〕 「マウスJTT-1抗原」をコードするcDNAのクローニング

##### 1. プロープの作製

実施例7で得たクローン「T132A7」を制限酵素EcoRIおよびNotIで消化して、「ラットJTT.1抗原」をコードするcDNA約0.9kbを切り出し、アガロースゲル電気泳動により分離した。分離したDNA断片を「QUIAEX gel extraction kit」(QUIA TEN社製)を用いて精製し、得られたDNA断片を「Ready-To-Go DNA labelling kit」(Pharmacia社製)を用いて<sup>32</sup>Pで標識した。この標識DNA断片をブランクハイブリダイゼーション用のプロープとして用いた。

## 2. cDNAライブラリーの作製

### 2- (1) poly (A)+RNAの抽出

実施例7-1-(1)と同様にして、ConAで刺激したマウス脾臓由来リンパ芽球 (約 $1 \times 10^6$  cells/ml) からのpoly (A)+RNAを抽出した。

### 2- (2) cDNAライブラリーの作製

前記で調製したpoly (A)+RNA 5mgを鋳型とし、oligo dT プライマー (Pharmacia社製) 及び「Time Saver cDNA Synthesis Kit」 (Pharmacia社製) を用いてcDNAを合成した。該cDNAにEcoRIアダプター付加した後、スパンカラム (Pharmacia社製) を用いてサイズ分画を行った。

### 2- (3) ベクターへの組み込み及びパッケージング

前記で得られたEcoRI末端を有するcDNAを、EcoRIで処理したベクターλZAPII (Stratagene社製) に連結した。連結反応には「DNA ligation Kit」 (宝酒造社製) を用いた。これをGIGA PACK II GOLD (Stratagene社製) を用いてin vitro packagingした後、得られたファージ粒子を用いて、E coli XL1Blue MRF' (Stratagene社製) を宿主として組み換えファージを含有するブラークからなるcDNAライブラリーを作製した。

## 3. cDNAライブラリーのスクリーニング

スクリーニングはRapid hybridization buffer (Amersham社製) を用いたブラークハイブリダイゼーション法 (Maniatis, T. et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) に従い行った。

前記で得られたcDNAライブラリー ( $1 \times 10^4$  個) を寒天プレートに播種し、Hybond-N nylon membrane (Amersham社製) を用いてレプリカを作製した。レプリカ及び前記9-1で作製した $^{32}$ P 標識プローブを用い、Rapid hybridization buffer (Amersham社製) 中でブラークハイブリダイゼーションを行った。1次スクリーニング及び2次スクリーニングを行い、5個のポジティブ・クローンを得た。各クロ

ーンをシングルブランクで単離後、Stratagene社Instruction Manualに従ってin vivo Excisionに供し、5クローンをplasmid DNAとして回収した。

#### 4. 塩基配列決定

5個のクローンの各々について、ジデオキシ (dideoxy) 法により、「Auto Read Sequencing Kit」(Pharmacia社製) 及び「A.L.F. DNA sequencer」(Pharmacia社製) を用いて塩基配列を決定した。該5クローン中の4個のクローンはすべて同じ塩基配列を含んでいた。「マウスJTT-1抗原」の全長をコードするcDNAの塩基配列及び推定アミノ酸配列を配列番号5に記載する。

図10から明らかなように、「マウスJTT-1抗原」は、「ラットJTT-1抗原」と同様に200アミノ酸残基から構成され、またマウス、ラット及びヒトの「JTT-1抗原」は、各々の間で有意なアミノ酸配列相同性(60%以上)を有していた。

#### 5. 「マウスJTT-1抗原」の遺伝子の染色体上の位置の解析

「マウスJTT-1抗原」をコードする遺伝子の染色体上の位置を、蛍光インサイチュウ (in situ) ハイブリダイゼーション法により解析した。

得られた「マウスJTT-1抗原」をコードするcDNAを<sup>32</sup>Pで標識して常法に従ってハイブリダイゼーション用プローブを作製した。このプローブを用いて、129 SVJ マウスゲノミックDNAライブラリー (STRATAGENE社製) をスクリーニングし、「マウスJTT-1抗原」をコードするエクソンを含むマウスゲノミックDNAクローンを取得した。該ゲノミックDNAの構造を模式的に示した図を図13に示す。

前記で得たゲノミックDNAクローンをニクトランスレーションにより、ジゴキシゲニンdUTP (digoxigenin dUTP) で標識しプローブとした。該標識プローブを分断したマウスDNAを結合させた後、50%ホルムアルデヒド、10%硫酸デキストラン及び2×SSCを含む溶液中で、マウス胚性線維芽細胞由来の正常な細胞分裂中期 (metaphase) 染色体にハイブリダイズさせた。特異的ハイブリダイゼーションシグナルは、ハイブリダイゼーション用スライドを蛍光標識した抗ジゴキシゲニン抗体中でインキュベートした後、DAPIで染色することにより検出した。初回の試



験においては、そのDNAサイズ及び現れたバンドの状況から、1番染色体と思われる最も巨大な染色体の近傍部分に特異的標識がなされた。この情報に基づき、1番染色体のセントロメア領域に特異的なプローブとともに前記ゲノミックDNAクローンを共ハイブリダーゼーションさせた。この結果、1番染色体のセントロメア領域とその近傍の領域が特異的に標識された。特異的ハイブリダーゼーションが見られた1番染色体(10サンプル)を解析した結果、前記ゲノミックDNAクローンはヘテロクロマチンとユークロマチンとの境界から1番染色体のテロメアまでの距離の33%の位置、即ち、マウス「CD28」及び「CTLA-4」の遺伝子の染色体上の位置と同一のバンド「1C3」に存在することが明らかとなった。総計80個の細胞分裂中期の細胞について解析した結果、79個の細胞で該位置に特異的標識が確認された。

この結果と実施例8で得られた結果、即ち「JTT-1抗原」と「CD28」及び「CTLA-4」との構造的類似性を考え合わせると、「JTT-1抗原」が「CD28」や「CTLA-4」と同様なコスティミュレトリースIGNALの伝達及び/またはリンパ球の活性化の制御に関与する重要な分子であることが推察される。

〔実施例10〕 「ラットJTT-1抗原」の変異体をコードするcDNAのクローニング

実施例7でクローニングした「ラットJTT-1抗原」のオールタナティブ・スプライシング変異体(alternative splicing variant)をコードするものと考えられる他の1つのcDNAを下記のようにクローニングした。

#### 1. プローブの作製

実施例7で得たクローン「T132A7」を制限酵素EcoRIおよびNotIで消化して、「ラットJTT.1抗原」をコードするcDNA約0.9kbを切り出し、アガロースゲル電気泳動により分離した。分離したDNA断片を「QUIAEX gel extraction kit」(QUIA TEN社製)を用いて精製し、得られたDNA断片を「Ready-To-Go DNA labelling kit」(Pharmacia社製)を用いて<sup>32</sup>Pで標識した。この標識DNA断片をブランクハイ

ブリダイゼーション用のプローブとして用いた。

## 2. cDNAライブラリーの作製

### 2- (1) poly (A)+RNAの抽出

実施例7-1-(1)と同様にして、ラット胸腺腫細胞株FTL435 (約 $1 \times 10^6$  cells/ml)からのpoly(A)+RNAを抽出した。

### 2- (2) cDNAライブラリーの作製

前記のように調製したpoly (A)+RNA 5mgを鋳型とし、oligo dT プライマー (Pharmacia社製) 及び「Time Saver cDNA Synthesis Kit」 (Pharmacia社製) を用いてcDNAを合成した。該cDNAにEcoRIアダプターを付加した後、スバンカラム (Pharmacia社製) を用いてサイズ分画を行った。

### 2- (3) ベクターへの組み込み及びパッケージング

前述のようにして得られたEcoRI末端を有するcDNAを、EcoRIで処理したベクター-lZAPII (Stratagene社製) に連結した。連結反応には「DNA ligation Kit」 (宝酒造社製) を用いた。これをGIGA PACK II GOLD (Stratagene社製) を用いてin vitro packagingした後、得られたファージ粒子をもちいて、E coli XL1Blue MRF' (Stratagene社製) を宿主として組み換えファージを含有するブランクからなるcDNAライブラリーを作製した。

## 3. cDNAライブラリーのスクリーニング

スクリーニングはRapid hybridization buffer (Amersham社製) を用いてブランクハイブリダイゼーション法 (Maniatis, T. et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) に従って行った。

前記で調製したcDNAライブラリー ( $1 \times 10^4$  個) を寒天プレートにまき、Hybond-N nylon membrane (Amersham社製) を用いてレプリカを作製した。該レプリカ及び前記10-1で作製した $^{32}$ P 標識プローブを用い、Rapid hybridization buffer (Amersham社製) 中でブランクハイブリダイゼーションを行った。1次スクリー

ニング及び2次スクリーニングを行い、2個のポジティブ・クローンを得た。各クローンをシングルブランクで単離後、Stratagene社Instruction Manualに従ってin vivo Excisionに供し、2クローンをplasmid DNAとして回収した。

#### 4. 塩基配列決定

2個のクローンの各々について、ジデオキシ (dideoxy) 法により「Auto Read Sequencing Kit」(Pharmacia社製) 及びA.L.F.DNA sequencer (Pharmacia社製) を用いて 塩基配列を決定した。2個のクローンはすべて同じ塩基配列を含んでいた。得られた「ラットJTT-1抗原」の全長をコードするcDNAの塩基配列及び推定アミノ酸配列を配列番号6に記載する。得られたcDNA配列から演繹されるアミノ酸配列(配列番号6)を、実施例7でクローニングした「ラットJTT-1抗原」をコードするcDNA配列から演繹されるアミノ酸配列(配列番号4)と比較した(図14)。その結果、図14から明らかなように、本試験でクローニングされたcDNAによりコードされるアミノ酸配列は、実施例7で得られた「ラットJTT.1抗原」をコードするcDNAによりコードされるアミノ酸配列と比べ、①C末端の3つの連続するアミノ酸配列(Met-Thr-Ser)がThr-Ala-Proに変化している点、並びに②該Thr-Ala-Proに続いてさらに16の連続するアミノ酸残基(Leu-Arg-Ala-Leu-Gly-Arg-Gly-Glu-His-Ser-Ser-Cys-Gln-Asp-Arg-Asn)が延長されているという2つの相違点以外は、全く同一のアミノ酸配列であった。このことから本試験でクローニングされたcDNAは、実施例7で得られた「ラットJTT.1抗原」のオールタナティブ・スプライシング変異体(alternative splicing valiant)をコードしていると考えられる。

#### 【実施例11】 組換え「ヒトJTT-1抗原」発現細胞の調製

実施例8で取得したプラスミドクローンpBSh41を、制限酵素EcoRIで消化して、「ヒトJTT-1抗原」の全長をコードするcDNAを含むDNA断片を切り出した。このDNA断片を、DNAライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて、同じく制限酵素EcoRIで処理したプラスミドpEFneo (Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 91, 158-162, 199

4) に挿入し発現ベクターを作製した。エレクトロポレーションにより、該ベクターでCHO-K1細胞 (ATCC: CCL-61) を形質転換した。細胞を、Geneticin (0.8 mg/ml; GIBCO BRL製) 及び10%ウシ胎児血清 (fetal calf serum) を含有するRPMI1640培地中で約2週間培養することにより、Geneticin耐性形質転換細胞を選別した。組換え「ヒトJTT-1抗原」の発現は、常法によりノーザンブローディングにより確認した。

#### [実施例12] 「ヒトJTT-1抗原」に対するモノクローナル抗体の調製

実施例11で調製した組換え「ヒトJTT-1抗原」を発現する形質転換細胞を、ホモジナイズし、超遠心分離 (100,000×g) して、細胞膜画分を含む遠心残さを回収し、PBSに懸濁させた。得られた細胞膜画分を、完全フロイドアジュバントとともにBALB/cマウスのフットパッド内に注射することにより初回免疫 (0日) した。さらに該細胞膜画分抗原を7日目、14日目および28日目という間隔でフットパッド内に投与した。最後の免疫から2日後にリンパ節細胞を採取した。該リンパ節細胞とマウスミエローマ細胞PA1 (JCR No.B0113; Res. Disclosure, Vol.217, p.155, 1982) とを5:1で混合し、融合剤としてポリエチレングリコール4000 (GIBCO製) を用いて細胞融合させることによりモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマの選択は、10%ウシ胎児血清とアミノプτεリンを含有するHAT含有ASF104培地 (味の素製) 中で培養することにより行った。各々のハイブリドーマの培養上清中に生成されたモノクローナル抗体の「ヒトJTT-1抗原」に対する反応性は、各々の培養上清を実施例11で調製した組換え「ヒトJTT-1抗原」を発現する形質転換細胞と反応させた後、FITC標識抗マウスIgG (Cappel製) と反応させることにより染色された細胞の蛍光強度をEPICS-ELITEフローサトメーターで測定することにより確認した。この結果、「ヒトJTT-1抗原」に反応性を有するモノクローナル抗体を産生する10種以上のハイブリドーマが得られたことが確認された。

これらのハイブリドーマの内の2種類 (各々クローンSA12及びSG430命名) の各

々 ( $10^6$ 乃至 $10^7$ 個/0.5ml/マウス)を、ICR nu/nuマウス(雌、7乃至8週齢)の腹腔内に注射した。10乃至20日後、マウスを麻酔下で開腹し、常法に従って採取した腹水から「ヒトJTT-1抗原」に反応性を有する2種類のモノクローナル抗体(SA12及びSG430)を大量調製した。

〔実施例13〕 「ヒトJTT-1抗原」に対するモノクローナル抗体のヒト末梢血リンパ球に対する効果

実施例8で述べたとおり、「JTT-1抗原」は「CD28」や「CTLA-4」と同様に免疫反応におけるリンパ球細胞の活性化の制御に関与する可能性を有すると考えられる。この可能性を実証するため、「ヒトJTT-1抗原」に対するモノクローナル抗体のヒトリンパ球に対する効果を細胞の増殖を指標として解析した。

96穴マクロタイタープレートの各ウェルに①実施例12で調製した「ヒトJTT-1抗原」に対するモノクローナル抗体SA12若しくはSG430のいずれか一方( $1\mu\text{g/ml}$ )のみ、または②モノクローナル抗体SA12若しくはSG430のいずれか一方( $1\mu\text{g/ml}$ )とリンパ球の活性化における第1シグナル付与のための抗CD3モノクローナル抗体OKT-3( $1\mu\text{g/ml}$ 、オーソ・ダイアノスティック・システムズ社製)との混合溶液を加えて $37^\circ\text{C}$ で1時間培養して各ウェルを該抗体でコーティングした。プレートをRPMI1640培地で洗浄した後、各ウェルに正常ヒト末梢血リンパ球( $1 \times 10^5$  cells/well)を加え、10%ウシ胎児血清を含むRPMI1640培地中で3日間培養した。必要に応じてPMA(phorbol myristate acetate:  $1\text{ ng/ml}$ )を添加した。次いで、各ウェルに $[^3\text{H}]$ チミジン( $3.7\mu\text{kBq/well}$ )を添加して、 $37^\circ\text{C}$ で6時間培養した。細胞を回収(ハーベスト)し、DNA内に取り込まれた $[^3\text{H}]$ チミジンの量を液体シンチレーションカウンター(ベックマン製)を用いて測定した。なお、いずれの抗体も加えない培養系を対照とした。結果を図15に示した。

モノクローナル抗体SA12またはSG430のいずれかの単独で処理した場合には、いずれの抗体を用いた場合にも対照に比べリンパ球が約10倍に増殖した。さらに、OKT3との併用の場合には、モノクローナル抗体SA12またはSG430のいずれを用いた

場合にもリンパ球が約100倍に増殖した。

この結果は、「JTT-1抗原」が、リンパ球の活性化の制御において機能することを示すものである。また、OKT3との併用により細胞増殖率が増幅されたことから、「JTT-1抗原」が「CD28」や「CTLA-4」と同様のコスティミュレイトリー・シグナルの伝達を担うことを示すものである。

〔実施例14〕 実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）に対する「JTT-2抗体」の効果

先に詳細に述べたように、近年、CD28/CTLA-4-CD80/CD86の間のシグナル伝達を調節することにより種々の自己免疫性疾患（慢性関節リウマチ、多発性硬化症、自己免疫性甲状腺炎、アレルギー性接触性皮膚炎、慢性炎症性皮膚疾患である扁平苔癬、全身性エリテマトーデス、インスリン依存性糖尿病及び乾癬など）の治療の試みが多数なされてきている。既に、種々の自己免疫疾患モデル動物（①ヒト全身性エリテマトーデス（SLE）のモデル、②多発性硬化症（MS）のモデルである実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）、③インスリン依存性糖尿病（IDDM）モデル、④グッドパスチャー（Goodpasture）の腎炎モデル、⑤ヒト慢性関節リウマチモデル）でその効果が確認されている。

本発明の「JTT-1抗原」が「CD28」や「CTLA-4」のようなリンパ球の活性化あるいはその抑制に関与する分子であるか否かを確認するため、多発性硬化症（MS）のモデルである実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）モデルラットを作製し、該モデルにおける「JTT-1抗原」に対するモノクローナル抗体の効果を解析した。

Hartleyモルモットの脳脊髄ホモジネート（800mg/ml生理食塩水）を等量のプロインド完全アジュバントと混和して免疫感作抗原としてのエマルジョンを調製した。該エマルジョンを、ルイスラット（雌、6週齢、15匹）の左右の足趾に各々0.25mlずつ皮内投与することにより免疫感作した。なお、該投与は、該ホモジネートの投与量がラット1匹あたり200mgとなるように行った。この免疫感作により、アレルギー性脳脊髄炎（EAE）を誘導させることができる。

免疫感作したラットを5匹ずつの3群に分け、各群毎に、次の①乃至③のいずれかを、免疫感作直後（0日）並びに該免疫感作から3日目、6日目、9日目及び12日目に静脈内投与した。

①実施例2で作製した「ラットJTT-1抗原」に対するモノクローナル抗体「JTT-2抗体」（投与量：2mg/ml PBS, 5mg/kg）；

②ステロイド剤プレドニゾン（投与量：4mg/ml PBS, 10mg/kg）；及び

③「ラットJTT-1抗原」に反応しない対照抗体（投与量：2mg/ml PBS, 5mg/kg）。

免疫感作から経時的に症状を観察し、EAE発症が認められた時点からその症状を次の基準にてスコア化することにより症状の程度を評価した。

（スコア1）尾の緊張の消失；

（スコア2）後肢のひきずり、及び軽度の麻痺；

（スコア3）後肢のひきずり、及び重度の麻痺；及び

（スコア4）全身の麻痺または死亡。

結果を図16に示す。対照抗体を投与した群では、免疫感作から11乃至15日目にEAE症状がピーク（スコア最大）となり、その後漸次回復した。一方、「JTT-2抗体」投与群では、感作後11日目のEAE症状の発症が有意に抑制された。この抑制効果はプレドニゾン投与群に比べ有意に高いものであった。

この結果は、「JTT-1抗原」は、外来抗原による免疫感作により惹起されるリンパ球の活性化をはじめとした免疫応答の誘導において機能する分子であり、「JTT-1抗原」あるいはそのリガンドの機能を制御することにより種々の自己免疫疾患の症状を抑制できることを示すものである。

〔実施例15〕 糸球体腎炎に対する「JTT-2抗体」の効果

実施例14と同様の目的のために、糸球体基底膜（GBM）腎炎モデルラットを作製し、該モデルにおける「JTT-1抗原」に対するモノクローナル抗体の効果を解析した。

コラゲナーゼにより消化したウシ糸球体基底膜（重井医学研究所製）を生理食

塩水で200 $\mu$ g/mlの濃度に希釈した後、フロインド完全アジュバントと混和して免疫感作抗原としてのエマルジョンを調製した。エーテル麻酔下で、ウィスター・キョート系ラット (wister kyoto, 約200 g, 48匹) の両後肢足底皮内に各々約0.2ml (抗原量: 約15 $\mu$ g) ずつ投与することにより免疫感作した。この免疫感作により糸球体基底膜 (GBM) 腎炎が誘導される。

免疫感作したラットを6匹ずつの8群に分け、各群毎に、次の①乃至③のいずれかを、免疫感作直後 (0日) 並びにその後1週間に3回ずつ5週間に渡り投与した。

①実施例2で作製した「ラットJTT-1抗原」に対するモノクローナル抗体「JTT-2抗体」 (投与量: 3mg/kg (2ml PBS/kg), 静脈内投与) ;

②陽性対照としてのステロイド剤ブレンドニゾロン (0.5% CMC (カルボキシメチルセルロース) 中に懸濁) (投与量: 3mg/kg (5ml/kg), 経口投与) ; 及び

③陰性対照としての0.5% CMC (投与量: 5ml/kg, 経口投与) 。

被験物質の投与後、各々のラットに滅菌水 (25ml/kg) を強制経口投与し、1匹ずつ代謝ケージ内に入れ絶食絶水下で5時間に渡り尿を採取した。採取した尿の量を測定後、尿中蛋白濃度をトネインTP-II (大塚製薬製) を用いて測定し、5時間あたりの尿中蛋白排泄量 (単位: mg蛋白/5時間) を算出した。前記尿採取並びに尿中蛋白量の測定は、免疫感作 (0日目) から1週間目、2週間目、3週間目及び4週間目の各時点で同様にして行った。

結果を図1.7に示した。対照群に比べ、「JTT-2抗体」投与群では、免疫感作から3週間目の尿中蛋白排泄量を有意に減少させた。

この結果は、「JTT-1抗原」は、外来抗原による免疫感作により惹起されるリンパ球の活性化をはじめとした免疫応答の誘導において機能する分子であり、「JTT-1抗原」あるいはそのリガンドの機能を制御することにより種々の自己免疫疾患の症状を抑制できることを示すものである。

〔実施例16〕 「JTT-1抗原」とIgFcとの融合蛋白の調製



実施例 8、13 乃至 15 で述べたように、本発明の「JTT-1 抗原」は、「CD28」や「CTLA-4」のようなリンパ球の活性化の制御に係わるコストイミュレイトリー・シグナル伝達に関与する分子であると考えられる。また、実施例 14 で述べたとおり、「CTLA-4」の細胞外ドメインとヒト免疫グロブリン IgG1 の Fc 領域とからなる融合タンパク (CTLA-4-IgFc) は、種々の自己免疫疾患の治療効果を有することが報告されている。本実施例では、CTLA-4-IgFc と同様の可溶性 JTT-1 抗原の種々自己免疫疾患の治療への適用可能性を確認するため「JTT-1 抗原」の細胞外領域をヒト IgFc とからなる融合蛋白を下記のように調製した。

(1) 「ラット JTT-1 抗原」とヒト IgG1-Fc との融合蛋白 (rJTT-1-IgFc) の調製

「ラット JTT-1 抗原」の細胞外領域をコードする cDNA を PCR で増幅するために、末端に XhoI 切断部位を有する 5' プライマー (5'-CTGCTCGAGATGAAGCCCTACTTCTCG-3'、配列番号 7) 及び BamHI 切断部位を有する 3' プライマー (5'-ACCCTACGGGTAACG GATCCTTCAGCTGGCAA-3'、配列番号 8) を設計、合成した。実施例 7 で取得した「ラット JTT-1 抗原」の全長をコードする cDNA をクローン「T132A7」を鋳型として該プライマーを用いて PCR を行い、両端に XhoI 及び BamHI 切断部位を各々有する「ラット JTT-1 抗原」の細胞外領域をコードする cDNA を含む cDNA を調製した。得られた PCR 産物を XhoI 及び BamHI で消化し、アガロースゲル電気泳動し、目的の細胞外領域をコードする cDNA 断片と予測される約 450bp のサイズのバンドを単離した。単離された cDNA 断片を、XhoI 及び BamHI で切断したプラスミド pBluescript II SK (+) (Stratagene 製) 中にサブクローニングした。自動蛍光 DNA シーケンサー (Applied Biosystems 製) による配列解析により、該 cDNA 断片は、「ラット JTT-1 抗原」(配列番号 4) のアミノ酸番号 1 乃至 141 迄の領域をコードする領域を含むことを確認した。

一方、融合パートナーとしてのヒト IgG1 の Fc をコードする DNA は、プラスミド (Cell, Vol.61, p.1303-1313, 1990 参照。マサチューセッツ・ゼネラル・ホスピタルのシード博士 (B. Seed) らにより作製) を、BamHI 及び XbaI で消化すること

によりBamHI-XbaI DNA断片（約1.3kb）として切り出した。この断片には、ヒトIgG1のヒンジ領域、C $\gamma$ 12、及びC $\gamma$ 13の各々コードするエクソンが含まれる。

前記のようにして作製した「ラットJTT-1抗原」の細胞外領域をコードするXhoI-BamHI断片、及びヒトIgG1のFc（「IgFc」と略記する）をコードするエクソンを含むBamHI-XbaI断片を、XhoI及びXbaIで切断したプラスミドpBluescript II SK（+）（Stratagene製）中にサブクローニングした。

次いで、該プラスミドをXhoI及びXbaIで消化し、「ラットJTT-1抗原」の細胞外領域とヒトIgFcとからなる融合DNAを含む約1.8kbのDNA断片を切りだした。この融合DNA断片を、T4 DNAリガーゼを用いて、発現ベクターpME18S（Medical Immunology, Vol.20, No.1, p.27-32, 1990、及び実験医学（別冊）：「遺伝子工学ハンドブック」、羊土社、第101-107頁、1992年）のXhoI及びXbaI部位に挿入し、プラスミドprJTT-1-IgFcを構築した。

エレクトロポレーション法により、10%ウシ胎児血清及びアンピシリンを含むDMEM培地中でサブコンフルエントに単層培養したHEK293細胞（ATCC CRL1573）を、プラスミドprJTT-1-IgFcで形質転換し、形質転換細胞を取得した。

形質転換細胞を、無血清ASF104培地中で72時間培養することによりrJTT-1-IgFcを発現させた。

rJTT-1-IgFcは、Protein G Sepharoseアフィニティーカラム（Pharmacia製）を用いて次のように精製した。

前記培養上清を遠心分離して得た遠心上清を、予め結合緩衝液（binding buffer）で平衡化したProtein G Sepharoseアフィニティーカラムに加えた。次いで、カラムを結合緩衝液で洗浄した後、溶出緩衝液（elution buffer）で溶出させた。溶出液を回収し、リン酸緩衝液で2回以上外液交換することにより透析し、精製rJTT-1-IgFcを得た。

アフィニティーカラムクロマトグラフィーの結果を図18に、また得られた精製rJTT-1-IgFcのSDS-PAGEの結果を図19に示す。

(2) 「ヒトJTT-1抗原」とヒトIgG1-Fcとの融合蛋白(hJTT-1-IgFc)の調製

PCR用における鋳型としてのcDNA及びプライマーを除いては、前記(1)と同様にして調製した。本試験では、鋳型としては、実施例8で作製した「ヒトJTT-1抗原」の全長をコードするcDNAを含むクローン「pBSh41」を用い、また5'プライマーとしては5'-TAACTGTTTCTCGAGAACATGAAGTCAGGC-3'(配列番号9)を、3'プライマーとしては5'-ATCCTATGGGTAACGGATCCTTCAGCTGGC-3'(配列番号10)を用いた。

アフィニティーカラムクロマトグラフィーの結果を図20に、また得られた精製hJTT-1-IgFcのSDS-PAGEの結果を図21に示す。

【実施例17】 「ラットJTT-1抗原」をコードするcDNA導入トランスジェニックマウスの作製

実施例7で取得した「ラットJTT-1抗原」の全長をコードするcDNAを、ニワトリ $\beta$ アクチンプロモーターを有する発現ベクターpCAGGS (Gene, Vol.108, p.193-200, 1991)に、DNA末端平滑化キット(タカラ社製)を用いて挿入し、プラスミドprJTT-1を得た。トランスジェニックマウス作製のために、prJTT-1を制限酵素処理して直鎖状にした。

仮親マウスには、白色ICRマウス(雌、日本エスエルシー社製)と精管結紮した白色ICRマウス(雄、日本エスエルシー社製)とを交配して得られたブラグ(または膣栓)を有する雌ICRマウスを用いた。また、「ラットJTT-1抗原」遺伝子を導入するための受精卵を得るための採卵用マウスは、PEAMEX(5ユニット、三共ゾーキ社製)及びプレグニール(5ユニット、オルガノン社製)を投与することにより過剰排卵させたBDF-1マウス(雌、日本エスエルシー社製)をBDF-1マウス(雄、日本エスエルシー社製)と交配させて作製した。交配後、BDF-1マウス(雌)から卵管部を摘出し、ヒアルロニダーゼ処理により受精卵のみを得、培地中で保存した。

受精卵への「ラットJTT-1抗原」遺伝子の導入は、顕微鏡下でマニピュレーター

を用いて常法により行った。受精卵を保定針で固定し、37℃条件下、トリスEDTA緩衝液で希釈した「ラットJTT-1抗原」をコードする前記直鎖状遺伝子を含む溶液を、DNA導入針を用いて受精卵の雄性前核内に注入（マイクロインジェクション）した。

遺伝子導入後、正常な状態を保持する受精卵のみを選別し、仮親マウス（白色ICRマウス）の卵巣内にある卵管采に、「ラットJTT-1抗原」遺伝子導入受精卵を挿入した。

仮親から生まれた子マウス（ファウンダー）の尾を切取りゲノム遺伝子を回収し、PCRによりマウスゲノム内に「ラットJTT-1抗原」遺伝子が導入されていることを確認した。次いで、このファウンダーを正常マウスと交配させることにより「ラットJTT-1抗原」を高発現するヘテロトランスジェニックマウスを作製した。該ヘテロマウス同士を掛け合わせるによりホモマウスを作製できる。

マイクロインジェクションした「ラットJTT-1抗原」遺伝子を含むコンストラクトの模式図を図22に示す。

〔実施例18〕 「マウスJTT-1抗原」をコードする内在性遺伝子を不活性化したノックアウトマウスの作製

#### （1）ターゲティングベクターの構築

「マウスJTT-1抗原」をコードする内在性遺伝子を相同組換え（日経サイエンス、1994年5月号、第52-62頁）により不活性化（ノックアウト）するためのターゲティングベクターを下記のようにして構築した。

実施例9-5でクローニングした「マウスJTT-1抗原」をコードする領域を含むマウスゲノミックDNAクローンを、PstI及びHindIIIで消化して得たPstI-HindIII断片（「相同DNA①」）を、プラスミドpGEM-3（プロメガ製）にサブクローニングした。次いで、pGEM-3をXhoIで開環し、プラスミドpMC1-neo-polyA（Stratagene製）をXhoI及びSalIで処理して切り出したネオマイシン耐性遺伝子（「neo」）を、該「相同DNA①」の上流に挿入、連結した。

前記マウスゲノミックDNAクローンをXhoI及びNotIで消化して、上述の「相同DNA①」より上流に位置する約5.5kbの遺伝子（「相同DNA②」）を切り出した。一方、前述の「neo-相同DNA①」を挿入したpGEM-3を、XhoI及びHindIIIで消化して「neo-相同DNA①」を切り出した。得られた「相同DNA②」と「neo-相同DNA①」を、NotI及びHindIIIで開環したプラスミドpSEAP2-CONT（クローンテック製）にサブクローニングした。

得られたプラスミド（「相同DNA②-neo-相同DNA①」が挿入されている）を、NruIを用いて「相同DNA①」の下流で消化、開環した後、プラスミドpMC1-TK（Stratagene製）をPvuIIで消化して得たチミジンキナーゼ遺伝子（「TK」）を、「相同DNA①」の下流に挿入、連結し、ターゲティングベクター（「相同DNA②-neo-相同DNA①-TK」が挿入されている）を得た。

## （2）ターゲティングベクターのES細胞への導入

15%ウシ胎児血清を含有するDMEM培地中で培養したマウス胚性幹細胞（ES細胞； embryonic stem cell）（Nature, Vol.362, p.255-258, 1993及びNature, Vol.326, p.292-295, 1987）をトリプシンで処理して単一細胞とした後、リン酸緩衝液で3回洗浄して細胞濃度を $1 \times 10^7$ 細胞/mlに調製した。細胞懸濁液1mlあたり25 $\mu$ gの前記ターゲティングベクターを加え、350V/cm（25 $\mu$ F）の条件下で電気パルスをおこなった。次いで、シャーレ（10cm）に $1 \times 10^7$ 細胞のES細胞を播種し維持培地中で1日培養した後、培地を選択培地（G418（250 $\mu$ g/ml）及び2 $\mu$ Mのガンシクロビルを含有する）に交換した。以後2日毎に培地交換を行い培養した。ターゲティングベクター導入から10日目に、マイクロピペットを用いて、顕微鏡下で573個のネオマイシン耐性ES細胞クローンを取得した。得られたES細胞クローンを、Feeder細胞を敷いた24穴プレートで各々別々に培養することにより、768個のネオマイシン耐性ES細胞のレプリカを取得した。

## （3）ノックアウトES細胞のスクリーニング

得られたネオマイシン耐性ES細胞の各々について、相同組換えによる「マウス

「JTT-1抗原」をコードする内在性遺伝子の破壊（ノックアウト）が起こっているか否かをPCRにより確認した。

PCRには、（１）前記ネオマイシン耐性遺伝子（「neo」）の配列に基づいて設計、合成したプライマー（5'-CGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGC-3'、配列番号11））及び②前記「相同DNA①」の配列に基づいて設計、合成したプライマー（5'-CATTCAAGTTTCAGGGAAGTAGTCCATGCGTTTC-3'、配列番号12）を用いた。

各々のネオマイシン耐性ES細胞について、ゲノミックDNAを抽出し、それらを鋳型とし、該プライマーを用いてPCRを行った。PCRは、94℃で3分の反応を1サイクル、94℃で1分、60℃で1分及び72℃で3分30秒の3つの反応からなる反応を30サイクル、並びに72℃で10分の反応を1サイクル行った後、4℃で保存した。このPCRにより約4 kb弱のフラグメントが増幅される場合には、そのES細胞クローンでは相同組換えによる「マウスJTT-1抗原」をコードする内在性遺伝子の破壊（ノックアウト）が起こっていると判断できる。

その結果、試験した768個のES細胞クローンのうち、3クローンにおいて目的のPCR産物が得られた。これら3クローンについてゲノミックサザンブロッティングを行い、さらに選抜及び確認をした。該3クローンのゲノミックDNAを抽出し、制限酵素BamHIで消化後、アガロースゲルで電気泳動を行った。これをナイロンメンブランに転写し、「マウスJTT-1」のゲノミックDNA配列により作製したプローブを用いて、ハイブリダイゼーションを行った。該プローブは、相同組換えが起こる部位より外側の配列であって、変異型ゲノムと通常型ゲノムをサイズ的に見分けられるような部位の配列を基に設計した。

その結果、3クローンの内の1クローンで、変異型と通常型の2本のバンドが確認された。このES細胞クローンを下記に述べるノックアウトマウスの作製に用いた。

#### （４）ノックアウトマウスの作製

前記で得た「マウスJTT-1抗原」をコードする内在性遺伝子が相同組換えにより

不活性化（ノックアウト）されたES細胞を、C57BL6マウス（日本チャールズリバー製）の雄雌を交配して得た胚盤胞に1胚あたり15個ずつ注入（マイクロインジェクション）した。注入直後に、偽妊娠処理してから2.5日目の仮親ICRマウス（日本クレア製）の子宮に子宮の片側あたり約10個ずつの胚盤胞を移植した。その結果、合計38匹の産児を得、その内の18匹が目的のキメラマウスであった。毛色への貢献度が80%以上のキメラマウスは、11匹であった。

次いで得られたキメラマウスを正常C57BL6マウスと交配し、ES細胞由来の毛色遺伝子によるアグーチ（agouti）色のマウスを得た。

#### 〔実施例19〕 抗体医薬組成物の調製

実施例1で調製した「ラットJTT-1抗原」に対するモノクローナル抗体「JTT-1抗体」及び「JTT-2抗体」の各々、並びに実施例12で調製した「ヒトJTT-1抗原」に対するモノクローナル抗体「SA12」及び「SG430」の各々（50～150  $\mu$ g/ml）を注射用蒸留水（10 ml）に加え注射剤とした。

#### 産業上の利用可能性

本発明により提供される、ヒト、マウス及びラットなどの哺乳動物由来の新規な細胞表面分子（「JTT-1抗原」と呼ぶ）は下記のような特徴を有するものである。

（1）T細胞の活性化に重要なコスティミュレイトリーシグナルを細胞間接着を介して伝達するT細胞等のリンパ球の細胞表面分子である「CD28」並びに該シグナルに連動して活性化T細胞等の活性化リンパ球の機能制御を行うT細胞等のリンパ球の細胞表面分子である「CTLA-4」と下記のような類似性を有する。

①システイン残基を含む20以上のアミノ酸残基が良く保存されている。

②リガンド結合領域として必須なプロリン残基の連続する配列「Pro-Pro-Pro（PPP）」が細胞外領域に保存されている。

③シグナル伝達領域として必須な配列「Tyr-Xaa-Xaa-Met（YxxM）（Xaa及びxは任意のアミノ酸を意味する。）が細胞内領域に保存されている。

④「マウスJTT-1抗原」をコードする遺伝子のマウス染色体上での位置は、マウスの「CD28」及び「CTLA-4」の位置と同く、「1C3」である。

(2)細胞間接着を媒介する機能を有する「CD28」及び「CTLA-4」と同様に、「JTT-1抗原」は胸腺細胞、ConAなどのマイトジェンで刺激したリンパ芽球及び胸腺腫細胞の細胞間接着を媒介する能力を有する。

(3)少なくとも胸腺細胞、ConAなどのマイトジェンで刺激したリンパ芽球細胞(活性化Tリンパ芽球細胞や活性化Bリンパ芽球細胞)、末梢血リンパ球及び胸腺腫細胞で強く発現する。

(4)「JTT-1抗原」に体する抗体は、ヒト末梢血リンパ球を有意に増殖させ、またその増殖は、T細胞の活性化に必須な抗原提示細胞からの第1のシグナルを受け取るT細胞上のTcR/CD3複合体を構成するCD3に対するモノクローナル抗体を共存させることによりさらに高い増殖を誘導する。

(5)「JTT-1抗原」に体する抗体を、実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)に投与することにより、その病状が有意に抑制がされる。

(6)「JTT-1抗原」に体する抗体を、糸球体基底膜(GBM)腎炎のモデルラットに投与することにより、その病状が有意に抑制がされる。

このような特徴から、本発明の「JTT-1抗原」は、前記「CD28」や「CTLA-4」と同様に、T細胞等のリンパ球の活性化に必須な第2のシグナル(コスティミュレイトリーシグナル)の伝達、並びに該シグナルに連動して活性化T細胞等の活性化リンパ球の機能制御を行う分子であると考えられる。

従って、そのような細胞表面分子を構成する本発明のポリペプチド、ポリペプチド断片、融合ポリペプチド及び抗体は、T細胞等のリンパ球の活性化並びに活性化リンパ球の機能制御の異常に起因する種々の自己免疫性疾患、アレルギー性疾患または炎症性疾患、具体的には、慢性関節リウマチ、多発性硬化症、自己免疫性甲状腺炎、アレルギー性接触性皮膚炎、慢性炎症性皮膚疾患である扁平苔癬、全身性エリテマトーデス、インスリン依存性糖尿病及び乾癬などの治療または予



防に極めて有用な医薬品を提供することが可能である。

同様に、本発明のポリペプチドあるいはポリペプチド断片をコードする遺伝子は、該種々疾患の遺伝子治療を可能とするだけでなく、アンチセンス医薬品を提供することが可能である。

本発明の抗体の中でも、ヒトモノクローナル抗体及びその医薬組成物は、マウス由来の抗体等の非ヒト哺乳動物由来の抗体からなる抗体医薬品の治療上の大きな問題点（副作用）であったヒトに対する抗原性を全く有しないことから、医薬品としての価値を劇的に増大させるものである。

また、本発明の遺伝子（DNA）、ポリペプチド、ポリペプチド断片及び抗体は、医薬品として有用なだけでなく、本発明の細胞表面分子と相互作用を有する分子（リガンド）の探索、該リガンドの機能の解明、並びに該リガンドをターゲットとした治療薬を開発するための試薬として有用である。

また、本発明のトランスジェニックマウスは、本発明の細胞表面分子である「JTT-1抗原」の生理学的機能を解明するためのモデル動物として有用であるだけでなく、「JTT-1抗原」の機能を制御（阻害、抑制、活性化、刺激など）する活性を有する種々の医薬（低分子化合物、抗体、アンチセンス、ポリペプチドなど）をスクリーニングするためのツールといして極めて有用である。即ち、そのような被験物質を該トランスジェニックマウスに投与し、該マウスの生体に起こる種々の生理学的、生物学的あるいは薬理学的パラメーターを測定、解析することにより投与された被験物質の活性を評価することが可能である。

また、本発明のノックアウトマウスは、該マウスの特徴を種々の側面（生理学的、生物学的、薬理学的、病理学的及び遺伝子的等の側面）から分析することにより、本発明の細胞表面分子の機能を解明することを可能とする。

配列表

- (1) 出願人の氏名又は名称： 日本たばこ産業株式会社
- (2) 発明の名称： 細胞間接着及びシグナル伝達を媒介する細胞表面分子
- (3) 整理番号： J 1 - 8 0 2 P C T
- (4) 出願番号：
- (5) 出願日：
- (6) 優先権のもととなった出願をした国名及び出願の番号
- 日本国 平成9年特許願第062290号
- 日本国 平成10年2月26日提出の特許願（整理番号J1-802DP1）
- (7) 優先日： 平成9年2月27日
- (8) 配列の数： 12

配列番号：1

配列の長さ：600

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：ヒト (human)

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：1 .. 600

特徴を決定した方法：E

配列：

ATG AAG TCA GGC CTC TGG TAT TTC TTT CTC

Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe Leu

97

1	5	10	
TTC TGC TTG CGC ATT AAA GTT TTA ACA GGA			60
Phe Cys Leu Arg Ile Lys Val Leu Thr Gly			
15	20		
GAA ATC AAT GGT TCT GCC AAT TAT GAG ATG			90
Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met			
25	30		
TTT ATA TTT CAC AAC GGA GGT GTA CAA ATT			120
Phe Ile Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile			
35	40		
TTA TGC AAA TAT CCT GAC ATT GTC CAG CAA			150
Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val Gln Gln			
45	50		
TTT AAA ATG CAG TTG CTG AAA GGG GGG CAA			180
Phe Lys Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln			
55	60		
ATA CTC TGC GAT CTC ACT AAG ACA AAA GGA			210
Ile Leu Cys Asp Leu Thr Lys Thr Lys Gly			
65	70		
AGT GGA AAC ACA GTG TCC ATT AAG AGT CTG			240
Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Ser Leu			
75	80		
AAA TTC TGC CAT TCT CAG TTA TCC AAC AAC			270
Lys Phe Cys His Ser Gln Leu Ser Asn Asn			
85	90		
AGT GTC TCT TTT TTT CTA TAC AAC TTG GAC			300

Ser Val Ser Phe Phe Leu Tyr Asn Leu Asp	
95	100
CAT TCT CAT GCC AAC TAT TAC TTC TGC AAC	330
His Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe Cys Asn	
105	110
CTA TCA ATT TTT GAT CCT CCT CCT TTT AAA	360
Leu Ser Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Lys	
115	120
GTA ACT CTT ACA GGA GGA TAT TTG CAT ATT	390
Val Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu His Ile	
125	130
TAT GAA TCA CAA CTT TGT TGC CAG CTG AAG	420
Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys	
135	140
TTC TGG TTA CCC ATA GGA TGT GCA GCC TTT	450
Phe Trp Leu Pro Ile Gly Cys Ala Ala Phe	
145	150
GTT GTA GTC TGC ATT TTG GGA TGC ATA CTT	480
Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu	
155	160
ATT TGT TGG CTT ACA AAA AAG AAG TAT TCA	510
Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser	
165	170
TCC AGT GTG CAC GAC CCT AAC GGT GAA TAC	540
Ser Ser Val His Asp Pro Asn Gly Glu Tyr	
175	180

99

ATG TTC ATG AGA GCA GTG AAC ACA GCC AAA 570

Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys

185 190

AAA TCT AGA CTC ACA GAT GTG ACC CTA TAA 600

Lys Ser Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu

195

配列番号 : 2

配列の長さ : 199

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

生物名 : ヒト (human)

配列 :

Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe Leu

1 5 10

Phe Cys Leu Arg Ile Lys Val Leu Thr Gly

15 20

Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met

25 30

Phe Ile Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile

35 40

Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val Gln Gln

45 50

Phe Lys Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln

100

55 60

Ile Leu Cys Asp Leu Thr Lys Thr Lys Gly

65 70

Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Ser Leu

75 80

Lys Phe Cys His Ser Gln Leu Ser Asn Asn

85 90

Ser Val Ser Phe Phe Leu Tyr Asn Leu Asp

95 100

His Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe Cys Asn

105 110

Leu Ser Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Lys

115 120

Val Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu His Ile

125 130

Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys

135 140

Phe Trp Leu Pro Ile Gly Cys Ala Ala Phe

145 150

Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu

155 160

Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser

165 170

Ser Ser Val His Asp Pro Asn Gly Glu Tyr

175 180

Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys

101

185

190

Lys Ser Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu

195

配列番号 : 3

配列の長さ : 2610

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (3' 及び5' 末端塩基配列を含むcDNA)

起源

生物名 : ヒト (human)

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 26 .. 625

特徴を決定した方法 : E

配列 :

GGACTGTTAA CTGTTTCTGG CAAAC 25

ATG AAG TCA GGC CTC TGG TAT TTC TTT CTC 55

Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe Leu

5 10

TTC TGC TTG CGC ATT AAA GTT TTA ACA GGA 85

Phe Cys Leu Arg Ile Lys Val Leu Thr Gly

15 20

GAA ATC AAT GGT TCT GCC AAT TAT GAG ATG 115

Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met

25 30

102

TTT ATA TTT CAC AAC GGA GGT GTA CAA ATT	145
Phe Ile Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile	
35 40	
TTA TGC AAA TAT CCT GAC ATT GTC CAG CAA	175
Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val Gln Gln	
45 50	
TTT AAA ATG CAG TTG CTG AAA GGG GGG CAA	205
Phe Lys Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln	
55 60	
ATA CTC TGC GAT CTC ACT AAG ACA AAA GGA	235
Ile Leu Cys Asp Leu Thr Lys Thr Lys Gly	
65 70	
AGT GGA AAC ACA GTG TCC ATT AAG AGT CTG	265
Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Ser Leu	
75 80	
AAA TTC TGC CAT TCT CAG TTA TCC AAC AAC	295
Lys Phe Cys His Ser Gln Leu Ser Asn Asn	
85 90	
AGT GTC TCT TTT TTT CTA TAC AAC TTG GAC	325
Ser Val Ser Phe Phe Leu Tyr Asn Leu Asp	
95 100	
CAT TCT CAT GCC AAC TAT TAC TTC TGC AAC	355
His Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe Cys Asn	
105 110	
CTA TCA ATT TTT GAT CCT CCT CCT TTT AAA	385
Leu Ser Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Lys	



103

115	120	
GTA ACT CTT ACA GGA GGA TAT TTG CAT ATT		415
Val Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu His Ile		
125	130	
TAT GAA TCA CAA CTT TGT TGC CAG CTG AAG		445
Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys		
135	140	
TTC TGG TTA CCC ATA GGA TGT GCA GCC TTT		475
Phe Trp Leu Pro Ile Gly Cys Ala Ala Phe		
145	150	
GTT GTA GTC TGC ATT TTG GGA TGC ATA CTT		505
Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu		
155	160	
ATT TGT TGG CTT ACA AAA AAG AAG TAT TCA		535
Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser		
165	170	
TCC AGT GTG CAC GAC CCT AAC GGT GAA TAC		565
Ser Ser Val His Asp Pro Asn Gly Glu Tyr		
175	180	
ATG TTC ATG AGA GCA GTG AAC ACA GCC AAA		595
Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys		
185	190	
AAA TCT AGA CTC ACA GAT GTG ACC CTA TAA		625
Lys Ser Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu		
195		
TATGGAAGCTC TGGCACCCAG GCATGAAGCA CGTTGGCCAG TTTTCCTCAA		675

CTTGAAGTGC AAGATTCTCT TATTTCCGGG ACCACGGAGA GTCTGACTTA 725  
ACTACATACA TCTTCTGCTG GTGTTTTGTT CAATCTGGAA GAATGACTGT 775  
ATCAGTCAAT GGGGATTTTA ACAGACTGCC TTGGTACTGC CGAGTCCTCT 825  
CAAAACAAAC ACCCTCTTGC AACCAGCTTT GGAGAAAGCC CAGCTCCTGT 875  
GTGCTCACTG GGAGTGGAAT CCCTGTCTCC ACATCTGCTC CTAGCAGTGC 925  
ATCAGCCAGT AAAACAAACA CATTTACAAG AAAAATGTTT TAAAGATGCC 975  
AGGGGTACTG AATCTGCAAA GCAAATGAGC AGCCAAGGAC CAGCATCTGT 1025  
CCGCATTTCA CTATCATACT ACCTCTTCTT TCTGTAGGGR TGAGAATTCC 1075  
TCTTTTAATC AGTCAAGGGA GATGCTTCAA AGCTGGRGCT ATTTTATTTT 1125  
TGAGATGTTG ATGTGAACTG TACATTAGTA CATACTCAGT ACTCTCCTTC 1175  
AATTGCTGAA CCCAGTTGA CCATTTTACC AAGACTTTAG ATGCTTTCTT 1225  
GTGCCCTCAA TTTCTTTTTT AAAAATACTT CTACATGACT GCTTGACAGC 1275  
CCAACAGCCA CTCTCAATAG AGAGCTATGT CTTACATTCT TTCCTCTGCT 1325  
GCTCAATAGT TTTATATATC TATGCATACA TATATACACA CATATGTATA 1375  
TAAAATTCAT AATGAATATA TTTGCCTATA TTCTCCCTAC AAGAATATTT 1425  
TTGCTCCAGA AAGACATGTT CTTTTCTCAA ATTCAGTTAA AATGGTTTAC 1475  
TTTGTTCAAG TTAGTGGTAG GAAACATTGC CCGGAATTGA AAGCAAATTT 1525  
AWWTATTAT CCTATTTTCT ACCATTATCT ATGTTTTCAT GGTGCTATTA 1575  
ATTACAAGTT TAGTTCCTTT TGTAGATCAT ATTAAAATTG CAAACAAAAT 1625  
CATCTTTAAT GGGCCAGCAT TCTCATGGGG TAGAGCAGAA TATTCATTTA 1675  
GCCTGAAAGC TGCAGTTACT ATAGGTTGCT GTCAGACTAT ACCCATGGTG 1725  
CCTCTGGGCT TGACAGGTCA AAATGGTCCC CATCAGCCTG GAGCAGCCCT 1775  
CCAGACCTGG GTGGAATTCC AGGGTTGAGA GACTCCCCTG AGCCAGAGGC 1825  
CACTAGGTAT TCTTGCTCCC AGAGGCTGAA GTCACCCTGG GAATCACAGT 1875  
GGTCTACCTG CATTATAAT TCCAGGATCT GTGAAGAGCA CATATGTGTC 1925  
AGGGCACAAT TCCCTCTCAT AAAAACCACA CAGCCTGGAA ATTGGCCCTG 1975

GCCCTTCAAG ATAGCCTTCT TTAGAATATG ATTTGGCTAG AAAGATTCTT 2025  
AAATATGTGG AATATGATTA TTCTTAGCTG GAATATTTTC TCTACTTCCT 2075  
GTCTGCATGC CCAAGGCTTC TGAAGCAGCC AATGTCGATG CAACAACATT 2125  
TGTAACCTTA GGTAAGCTGG GATTATGTTG TAGTTTAACA TTTTGTAAC 2175  
GTGTGCTTAT AGTTTACAAG TGAGACCCGA TATGTCATTA TGCATACTTA 2225  
TATTATCTTA AGCATGTGTA ATGCTGGATG TGTACAGTAC AGTACWTAAC 2275  
TTGTAATTTG AATCTAGTAT GGTGTTCTGT TTTCAGCTGA CTTGGACAAC 2325  
CTGACTGGCT TTGCACAGGT GTTCCCTGAG TTGTTTGCAG GTTCTGTGT 2375  
GTGGGGTGGG GTATGGGGAG GAGAACCCTC ATGGTGGCCC ACCTGGCCTG 2425  
GTTGTCCAAG CTGTGCCTCG ACACATCCTC ATCCCAAGCA TGGGACACCT 2475  
CAAGATGAAT AATAATTCAC AAAATTTCTG TGAAATCAAA TCCAGTTTAA 2525  
AGAGGAGCCA CTTATCAAAG AGATTTTAAC AGTAGTAAGA AGGCAAAGAA 2575  
TAAACATTTG ATATTCAGCA ACTGAAAAAA AAAAA 2610

配列番号 : 4

配列の長さ : 2072

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (3' 及び5' 末端塩基配列を含むcDNA)

起源

生物名 : ラット (rat)

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 35 .. 637

特徴を決定した方法 : E

配列 :

106

CTGGAGGGGA AGAGTGCAGC TGTTCTGGC AGAC	34
ATG AAG CCC TAC TTC TCG TGC GTC TTT GTC	64
Met Lys Pro Tyr Phe Ser Cys Val Phe Val	
1 5 10	
TTC TGC TTC CTA ATC AAA CTT TTA ACA GGA	94
Phe Cys Phe Leu Ile Lys Leu Leu Thr Gly	
15 20	
GAA CTC AAT GAC TTG GCC AAT CAC AGG ATG	124
Glu Leu Asn Asp Leu Ala Asn His Arg Met	
25 30	
TTT TCG TTT CAC GAT GGA GGT GTA CAG ATT	154
Phe Ser Phe His Asp Gly Gly Val Gln Ile	
35 40	
TCT TGT AAC TAC CCT GAG ACT GTC CAG CAG	184
Ser Cys Asn Tyr Pro Glu Thr Val Gln Gln	
45 50	
TTA AAA ATG CAG TTG TTC AAA GAC AGA GAA	214
Leu Lys Met Gln Leu Phe Lys Asp Arg Glu	
55 60	
GTC CTC TGC GAC CTC ACC AAG ACC AAG GGA	244
Val Leu Cys Asp Leu Thr Lys Thr Lys Gly	
65 70	
AGC GGA AAC ACC GTG TCC ATC AAG AAT CCG	274
Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Asn Pro	
75 80	
ATG TCC TGT CCA TAT CAG CTG TCC AAC AAC	304

107

Met Ser Cys Pro Tyr Gln Leu Ser Asn Asn

85

90

AGT GTC TCT TTT TTC CTA GAC AAC GCA GAC

334

Ser Val Ser Phe Phe Leu Asp Asn Ala Asp

95

100

AGC TCC CAG GGC AGC TAC TTT TTA TGC AGC

364

Ser Ser Gln Gly Ser Tyr Phe Leu Cys Ser

105

110

CTG TCG ATT TTC GAC CCA CCC CCT TTT CAA

394

Leu Ser Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Gln

115

120

GAA AAG AAC CTT AGT GGA GGA TAT TTG CTT

424

Glu Lys Asn Leu Ser Gly Gly Tyr Leu Leu

125

130

ATT TAT GAA TCC CAG CTT TGT TGC CAG CTG

454

Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu

135

140

AAG CTT TGG TTA CCC GTA GGG TGT GCA GCT

484

Lys Leu Trp Leu Pro Val Gly Cys Ala Ala

145

150

TTT GTG GCA GCG CTC CTT TTT GGA TGC ATA

514

Phe Val Ala Ala Leu Leu Phe Gly Cys Ile

155

160

TTT ATC GTC TGG TTT GCA AAA AAG AAG TAC

544

Phe Ile Val Trp Phe Ala Lys Lys Lys Tyr

165

170

108

AGA TCC AGT GTG CAC GAC CCT AAT AGC GAG 574  
Arg Ser Ser Val His Asp Pro Asn Ser Glu  
175 180

TAC ATG TTC ATG GCG GCA GTC AAC ACA AAC 604  
Tyr Met Phe Met Ala Ala Val Asn Thr Asn  
185 190

AAA AAG TCC AGA CTT GCA GGT ATG ACC TCA 634  
Lys Lys Ser Arg Leu Ala Gly Met Thr Ser  
195 200

TAA 637

TCTGGAACAC GGGAACCCAT GGAGGAACTA CACTGTCTAG TTCCCCTGAA 687  
ACTTGAATGG AGAAAGTCTT CTATTTTCTG GACCACAGGG CATCTGACTT 737  
GATTAAC TAC TGATACCTCC TTTTGGKGT TTGTTTGTCT GGATCAGTGA 787  
CTATCAGTCA CTCGGAATTT CAGCAGACTG CCCTGGGTTT GCTGAGTCCT 837  
TTTAAGGCAA ACCCCTTCTT ATAGAAGACC CGGCTCATAT GTATTCAACA 887  
AACAGACCTC ACTGGGATAC AATCCCCTCT TTCTGCGCCT GCTTCTAGCT 937  
ATGCACCGGC CAGCAAGACA AACATATCTC CAGCATTTTT AAAAAATGC 987  
CAGGGTATGA ATCTGTAAAG TACACAGGCA GCCATTGACC ACCGTCTGTC 1037  
CTCGTTTTTT CAGATTCTAT TTTTTTCCAT AGAGATCAGC ATTCCTTCTA 1087  
GAATCAGACA GTAGAGGGAG ATGCTTCACA ACAGAAGCTC TTATGTTTCT 1137  
GAGATGTTGA TGAATTCATG CTTTAGTACC ACCATGTTCT CTAACAACCT 1187  
CTATATTCCA GCTGATCACT GCTTCAGGGC TTAGATGCCT GCTTTTGCCT 1237  
TCAAGTCTCC CCTTAAAGAT ACTCCCACAG GTCTACTTGG TGGCCTGCAG 1287  
CCACTCTGAA TAGGAAGTTT GGTCTACAAT TTCCCCCTC TGCTGCTCAA 1337  
AAAAAAAAT TAGTAGATAT GATTTTCCCA TATTCTCCCT GCCAAAAGTAA 1387  
TTTTTTCCAG CAAAGACATC TAAATTCAGT TAATATGGTT TACTGTGTTG 1437

ATATTAGTGG CAGTAAACAT TTCTCAGAAT CAAAAGCAAA TTAATTTTGC 1487  
GGTGGTGTTC TTCTACCATT ATCTTGGGTT TCCATGGTGC TATTACTCAC 1537  
AAGTTTAGCT ATTTTTTTAT GCATCATATT AAAGTTGCAA GCAAGCAGAG 1587  
CAACCCTCGG TTAATGGGCA AACATTCTCC TGGGGTAGAA TGAATTGTCT 1637  
ATTTAGCCCG AAAACTGCAG TTTCTGTGGG TGGCTGCCAG ACTACAGCCG 1687  
TGCTTTGCTC TGGCTTTGAC AGGTTGAAAT AGYCCCCATG ASCSTGGAAC 1737  
AGWACTCCAG ACTGTGCTGG AGTCCCAAAG TTAGGAGGGC CATGGAGCCT 1787  
GGGACAGGCT GCTGCTTTGG TCTTTAGGAT CTAGGAARAA TTACAGAGGG 1837  
GCCAAGACAG AGTTCCTCC CCTAGAACT GTGCAGCCTG GAAGTCAGCC 1887  
CTGGCACTTT AAGATAGCCT TCTTTAGAAC ATGAGTTAGT TGGTAGTATT 1937  
CTGACGTGTA AACAGCCTAT KGTTGCTCGG AGCTGGACCA TTTTCTCCAC 1987  
TTCCCTGTCT GCATGCCTAA GACTTCTAGA GCAGCCAACG TATATGCAAC 2037  
ATTAAAGAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAA 2072

配列番号 : 5

配列の長さ : 603

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

生物名 : マウス (mouse)

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 1 .. 603

特徴を決定した方法 : E

配列 :

110

ATG AAG CCG TAC TTC TGC CAT GTC TTT GTC	30
Met Lys Pro Tyr Phe Cys His Val Phe Val	
1 5 10	
TTC TGC TTC CTA ATC AGA CTT TTA ACA GGA	60
Phe Cys Phe Leu Ile Arg Leu Leu Thr Gly	
15 20	
GAA ATC AAT GGC TCG GCC GAT CAT AGG ATG	90
Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asp His Arg Met	
25 30	
TTT TCA TTT CAC AAT GGA GGT GTA CAG ATT	120
Phe Ser Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile	
35 40	
TCT TGT AAA TAC CCT GAG ACT GTC CAG CAG	150
Ser Cys Lys Tyr Pro Glu Thr Val Gln Gln	
45 50	
TTA AAA ATG CGA TTG TTC AGA GAG AGA GAA	180
Leu Lys Met Arg Leu Phe Arg Glu Arg Glu	
55 60	
GTC CTC TGC GAA CTC ACC AAG ACC AAG GGA	210
Val Leu Cys Glu Leu Thr Lys Thr Lys Gly	
65 70	
AGC GGA AAT GCG GTG TCC ATC AAG AAT CCA	240
Ser Gly Asn Ala Val Ser Ile Lys Asn Pro	
75 80	
ATG CTC TGT CTA TAT CAT CTG TCA AAC AAC	270
Met Leu Cys Leu Tyr His Leu Ser Asn Asn	



111

85	90	
AGC GTC TCT TTT TTC CTA AAC AAC CCA GAC	300	
Ser Val Ser Phe Phe Leu Asn Asn Pro Asp		
95	100	
AGC TCC CAG GGA AGC TAT TAC TTC TGC AGC	330	
Ser Ser Gln Gly Ser Tyr Tyr Phe Cys Ser		
105	110	
CTG TCC ATT TTT GAC CCA CCT CCT TTT CAA	360	
Leu Ser Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Gln		
115	120	
GAA AGG AAC CTT AGT GGA GGA TAT TTG CAT	390	
Glu Arg Asn Leu Ser Gly Gly Tyr Leu His		
125	130	
ATT TAT GAA TCC CAG CTC TGC TGC CAG CTG	420	
Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu		
135	140	
AAG CTC TGG CTA CCC GTA GGG TTG CCA GCT	450	
Lys Leu Trp Leu Pro Val Gly Leu Pro Ala		
145	150	
TTC GTT GTG GTA CTC CTT TTT GGA TGC ATA	480	
Phe Val Val Val Leu Leu Phe Gly Cys Ile		
155	160	
CTT ATC ATC TGG TTT TCA AAA AAG AAA TAC	510	
Leu Ile Ile Trp Phe Ser Lys Lys Lys Tyr		
165	170	
GGA TCC AGT GTG CAT GAC CCT AAT AGT GAA	540	

112

Gly Ser Ser Val His Asp Pro Asn Ser Glu

175 180

TAC ATG TTC ATG GCG GCA GTC AAC ACA AAC

570

Tyr Met Phe Met Ala Ala Val Asn Thr Asn

185 190

AAA AAG TCT AGA CTT GCA GGT GTG ACC TCA

600

Lys Lys Ser Arg Leu Ala Gly Val Thr Ser

195 200

TAA

603

配列番号 : 6

配列の長さ : 836

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (3' 及び5' 末端塩基配列を含むcDNA)

起源

生物名 : ラット (rat)

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 35 .. 685

特徴を決定した方法 : E

配列 :

CTGGAGGGGA AGAGTGCAGC TGTTCCTGGC AGAC

34

ATG AAG CCC TAC TTC TCG TGC GTC TTT GTC

64

Met Lys Pro Tyr Phe Ser Cys Val Phe Val

1 5 10

113

TTC TGC TTC CTA ATC AAA CTT TTA ACA GGA	94
Phe Cys Phe Leu Ile Lys Leu Leu The Gly	
15 20	
GAA CTC AAT GAC TTG GCC AAT CAC AGG ATG	124
Glu Leu Asn Asp Leu Ala Asn His Arg Met	
25 30	
TTT TCG TTT CAC GAT GGA GGT GTA CAG ATT	154
Phe Ser Phe His Asp Gly Gly Val Gln Ile	
35 40	
TCT TGT AAC TAC CCT GAG ACT GTC CAG CAG	184
Ser Cys Asn Tyr Pro Glu Thr Val Gln Gln	
45 50	
TTA AAA ATG CAG TTG TTC AAA GAC AGA GAA	214
Leu Lys Met Gln Leu Phe Lys Asp Arg Glu	
55 60	
GTC CTC TGC GAC CTC ACC AAG ACC AAG GGA	244
Val Leu Cys Asp Leu Thr Lys Thr Lys Gly	
65 70	
AGC GGA AAC ACC GTG TCC ATC AAG AAT CCG	274
Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Asn Pro	
75 80	
ATG TCC TGT CCA TAT CAG CTG TCC AAC AAC	304
Met Ser Cys Pro Tyr Gln Leu Ser Asn Asn	
85 90	
AGT GTC TCT TTT TTC CTA GAC AAC GCA GAC	334
Ser Val Ser Phe Phe Leu Asp Asn Ala Asp	

114

95	100	
AGC TCC CAG GGC AGC TAC TTT TTA TGC AGC		364
Ser Ser Gln Gly Ser Tyr Phe Leu Cys Ser		
105	110	
CTG TCG ATT TTC GAC CCA CCC CCT TTT CAA		394
Leu Ser Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Gln		
115	120	
GAA AAG AAC CTT AGT GGA GGA TAT TTG CTT		424
Glu Lys Asn Leu Ser Gly Gly Tyr Leu Leu		
125	130	
ATT TAT GAA TCC CAG CTT TGT TGC CAG CTG		454
Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu		
135	140	
AAG CTT TGG TTA CCC GTA GGG TGT GCA GCT		484
Lys Leu Trp Leu Pro Val Gly Cys Ala Ala		
145	150	
TTT GTG GCA GCG CTC CTT TTT GGA TGC ATA		514
Phe Val Ala Ala Leu Leu Phe Gly Cys Ile		
155	160	
TTT ATC GTC TGG TTT GCA AAA AAG AAG TAC		544
Phe Ile Val Trp Phe Ala Lys Lys Lys Tyr		
165	170	
AGA TCC AGT GTG CAC GAC CCT AAT AGC GAG		574
Arg Ser Ser Val His Asp Pro Asn Ser Glu		
175	180	
TAC ATG TTC ATG GCG GCA GTC AAC ACA AAC		604

115

Tyr Met Phe Met Ala Ala Val Asn Thr Asn

185

190

AAA AAG TCC AGA CTT GCA GGT ACA GCA CCC

634

Lys Lys Ser Arg Leu Ala Gly Thr Ala Pro

195

200

CTT AGG GCT TTG GGG AGA GGA GAA CAC TCT

664

Leu Arg Ala Leu Gly Arg Gly Glu His Ser

205

210

TCA TGT CAA GAC CGG AAT TAA

685

Ser Cys Gln Asp Arg Asn

215

TTTGTTTATT TCTATTTTAA AAGAAAGACA TTTTTTCCCC TAAAGATAAT 735

TTTTGTATTT TTATGTGAAA GTCTGAATCT TCATTTTAAC TCGACTTATA 785

TACTCTGTGG TATATTAAAA ATAATGTTTG TGAAAAAAAA AAAAAAAAAA 835

A 836

配列番号 : 7

配列の長さ : 27

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列の特徴

特徴を表す記号 : primer bind

存在位置 : 1 .. 27

特徴を決定した方法 : E

配列 :

116

CTGCTCGAGA TGAAGCCCTA CTTCTCG

27

配列番号 : 8

配列の長さ : 32

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列の特徴

特徴を表す記号 : primer bind

存在位置 : 1 .. 32

特徴を決定した方法 : E

配列 :

ACCCTACGGG TAACGGATCC TTCAGCTGGC AA

32

配列番号 : 9

配列の長さ : 30

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列の特徴

特徴を表す記号 : primer bind

存在位置 : 1 .. 30

特徴を決定した方法 : E

配列 :

TAACTGTTTC TCGAGAACAT GAAGTCAGGC

30

配列番号 : 10

配列の長さ : 30

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列の特徴

特徴を表す記号 : primer bind

存在位置 : 1 .. 30

特徴を決定した方法 : E

配列 :

ATCCTATGGG TAACGGATCC TTCAGCTGGC

30

配列番号 : 11

配列の長さ : 35

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列の特徴

特徴を表す記号 : primer bind

存在位置 : 1 .. 35

特徴を決定した方法 : E

配列 :

CGTGATATTG CTGAAGAGCT TGGCGGCGAA TGGGC

35

配列番号 : 12

配列の長さ : 34

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列の特徴

特徴を表す記号：primer bind

存在位置：1 .. 34

特徴を決定した方法：E

配列：

CATTCAAGTT TCAGGGAAGT AGTCCATGCG TTTC

34



## 請求の範囲

1. 下記の特徴を有する細胞表面分子を構成するポリペプチド：

(a) 少なくとも胸腺細胞及びマイトジェン (mitogen) で刺激したリンパ芽球細胞で発現する；

(b) 該細胞表面分子に反応性を有する抗体は、マイトジェンで刺激したリンパ芽球細胞間の接着を誘導する；

(c) 該細胞表面分子に反応性を有する抗体は、CD 3に反応性を有する抗体との共存下で末梢血リンパ球の増殖を誘導する；

(d) 細胞外領域にPhe-Asp-Pro-Pro-Pro-Pheで表わされる部分アミノ酸配列を有する；及び

(e) 細胞内領域にTyr-Met-Phe-Metで表わされる部分アミノ酸配列を有する。

2. 該ポリペプチドが、配列番号2に記載のアミノ酸配列、または配列番号2に記載のアミノ酸配列中のアミノ酸において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加されたアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項1に記載のポリペプチド。

3. 該ポリペプチドが、配列番号1に記載の塩基配列からなるDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされることを特徴とする請求項1に記載のポリペプチド。

4. 該ポリペプチドが、配列番号2に記載のアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項1に記載のポリペプチド。

5. 該細胞表面分子が、ヒト由来の細胞表面分子であることを特徴とする請求項1乃至請求項4のいずれかに記載のポリペプチド。

6. 請求項1乃至請求項5のいずれかに記載のポリペプチドをコードする遺伝子。

7. 該遺伝子が、cDNAであることを特徴とする請求項6に記載の遺伝子。

8. 該cDNAが、配列番号1に記載の塩基配列を有することを特徴とする請求

項 7 に記載の遺伝子。

9. 該 cDNA が、配列番号 3 の塩基番号 26 乃至 625 に記載の塩基配列、配列番号 4 の塩基番号 35 乃至 637 に記載の塩基配列、配列番号 5 の塩基番号 1 乃至 603 に記載の塩基配列、または配列番号 6 の塩基番号 35 乃至 685 に記載の塩基配列のいずれかを含むことを特徴とする請求項 7 に記載の遺伝子。

10. 請求項 6 乃至請求項 9 のいずれかに記載の遺伝子を含有するベクター。

11. 請求項 10 に記載のベクターが導入された形質転換体。

12. 国際寄託番号 FERM BP-5725 で識別される形質転換体。

13. 請求項 1 乃至請求項 5 のいずれかに記載のポリペプチドの細胞外領域からなるポリペプチド断片。

14. 該ポリペプチドが、配列番号 2 に記載されるアミノ酸配列を有するヒト由来のポリペプチドであることを特徴とする請求項 13 に記載のポリペプチド断片。

15. 請求項 13 または請求項 14 に記載のポリペプチド断片をコードする遺伝子。

16. 請求項 1 乃至請求項 5 のいずれかに記載のポリペプチドの細胞外領域からなるポリペプチド断片がジスルフィド結合により結合して形成されるホモダイマー分子。

17. 該ポリペプチドが、配列番号 2 に記載されるアミノ酸配列を有するヒト由来のポリペプチドであることを特徴とする請求項 16 に記載のホモダイマー分子。

18. 請求項 14 に記載のポリペプチド断片若しくは請求項 17 に記載のホモダイマー分子のいずれか一方または両方と薬学的に許容されうる担体を含んでなる医薬組成物。

19. 請求項 1 乃至請求項 5 のいずれかに記載のポリペプチドの細胞外領域とヒトの免疫グロブリン (Ig) の重鎖の定常領域または定常領域の一部とからなる融合ポリペプチド。

20. 免疫グロブリンが、IgG であることを特徴とする請求項 19 に記載の融

合ポリペプチド。

21. 定常領域の一部が、IgGのヒンジ領域、C2ドメイン及びC3ドメインからなることを特徴とする請求項19に記載の融合ポリペプチド。

22. 該ポリペプチドが、配列番号2に記載されるアミノ酸配列を有するヒト由来のポリペプチドであることを特徴とする請求項19乃至請求項21のいずれかに記載の融合ポリペプチド。

23. 請求項19乃至請求項22のいずれかに記載の融合ポリペプチドがジスルフィド結合により結合して形成されるホモダイマー分子。

24. 請求項22に記載の融合ポリペプチドがジスルフィド結合により結合して形成されるホモダイマー分子。

25. 請求項22に記載の融合ポリペプチド若しくは請求項24に記載のホモダイマー分子のいずれか一方または両方と薬学的に許容されうる担体を含んでなる医薬組成物。

26. 該医薬組成物が、自己免疫疾患またはアレルギー性疾患の治療または該疾患症状の抑制に用いられることを特徴とする請求項25に記載の医薬組成物。

27. 請求項1乃至請求項5のいずれかに記載のポリペプチド、請求項13若しくは請求項14に記載のポリペプチド断片または該ポリペプチドにより構成される細胞表面分子に反応性を有する抗体またはその一部。

28. 該抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項27に記載の抗体またはその一部。

29. 配列番号2に記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、請求項14に記載のポリペプチド断片または該ポリペプチドから構成されるヒト由来の細胞表面分子に反応性を有するモノクローナル抗体またはその一部。

30. 請求項1乃至請求項5のいずれかに記載のポリペプチドまたは該ポリペプチドにより構成される細胞表面分子に反応性を有するモノクローナル抗体であって、該モノクローナル抗体のマイトジェンで刺激したリンバ芽球細胞への作用が、

国際寄託番号 FERM BP-5707で識別されるハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体がマイトジェンで刺激したラットリンパ芽球細胞に示す作用と実質的に同一であるモノクローナル抗体またはその一部。

31. 請求項1乃至請求項5のいずれかに記載のポリペプチドまたは該ポリペプチドにより構成される細胞表面分子に反応性を有するモノクローナル抗体であって、該モノクローナル抗体のマイトジェンで刺激したリンパ芽球細胞への作用が、国際寄託番号 FERM BP-5708で識別されるハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体がマイトジェンで刺激したラットリンパ芽球細胞に示す作用と実質的に同一であるモノクローナル抗体またはその一部。

32. 請求項29に記載のモノクローナル抗体またはその一部と薬学的に許容される担体を含んでなる医薬組成物。

33. 該医薬組成物が、自己免疫疾患またはアレルギー性疾患の治療または該疾患症状の抑制に用いられることを特徴とする請求項32に記載の医薬組成物。

34. 請求項28乃至請求項31のいずれかに記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

35. 請求項1に記載のポリペプチドをコードする遺伝子であって、配列番号1に記載される塩基配列を含むヒト由来の遺伝子または配列番号4の塩基番号35乃至637に記載される塩基配列を含むラット由来の遺伝子が、マウスの内在性遺伝子に組み込まれていることを特徴とするトランスジェニックマウス。

36. 請求項1に記載のポリペプチドであって配列番号5に記載される遺伝子によりコードされるアミノ酸配列を有するマウス由来のポリペプチドが産生されないように、該ポリペプチドをコードするマウスの内在性遺伝子が不活性化されていることを特徴とするノックアウトマウス。

図 1

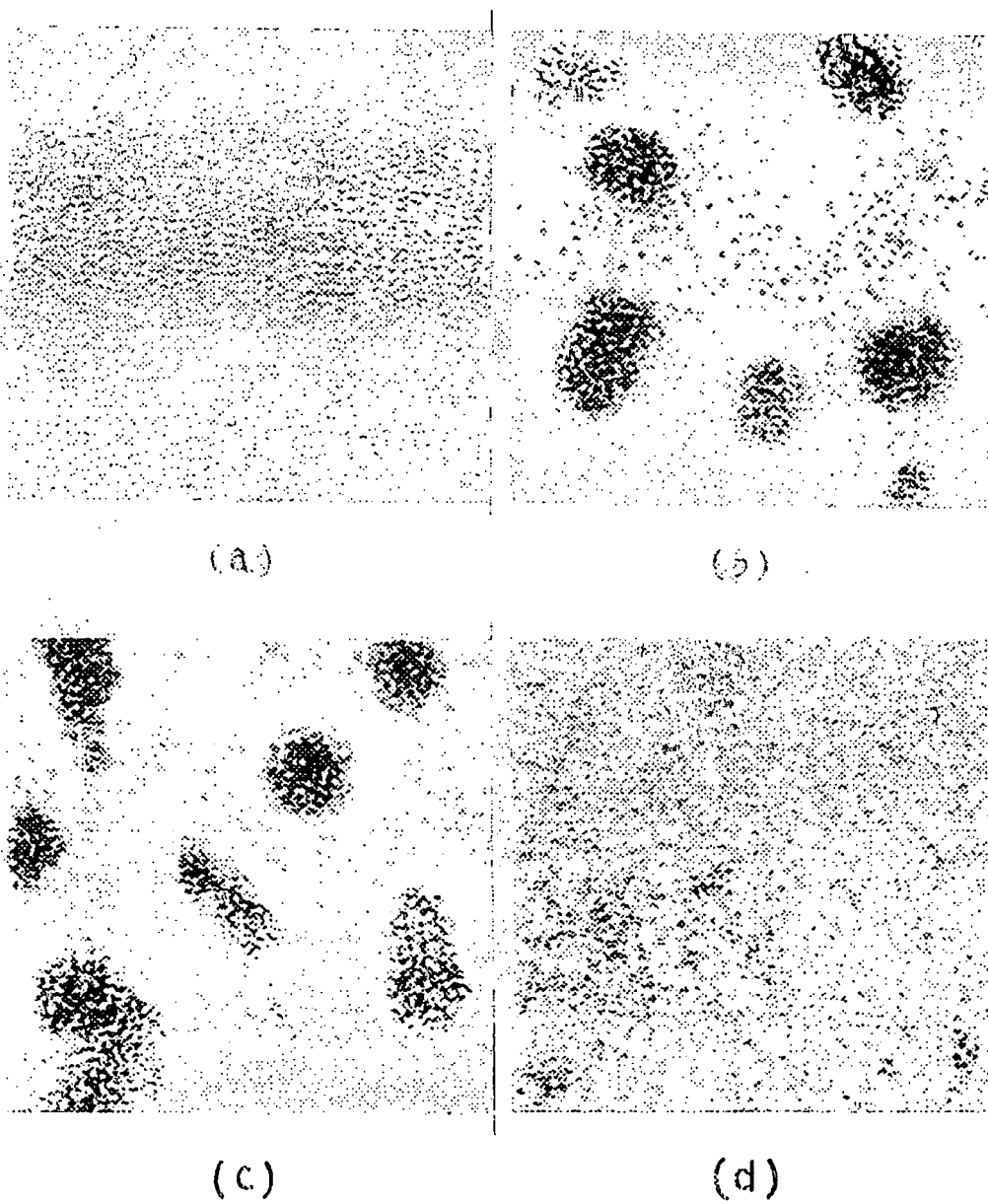
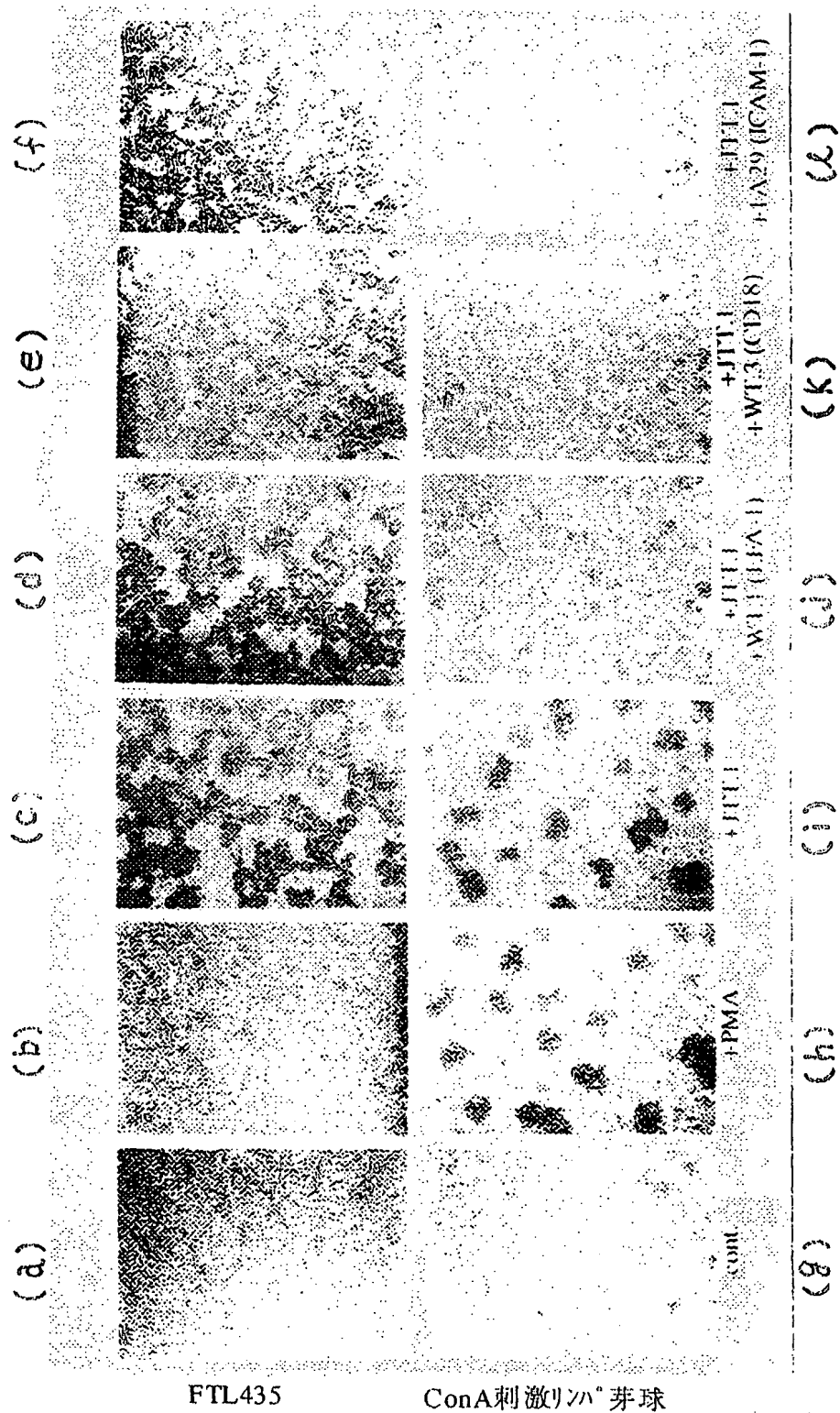
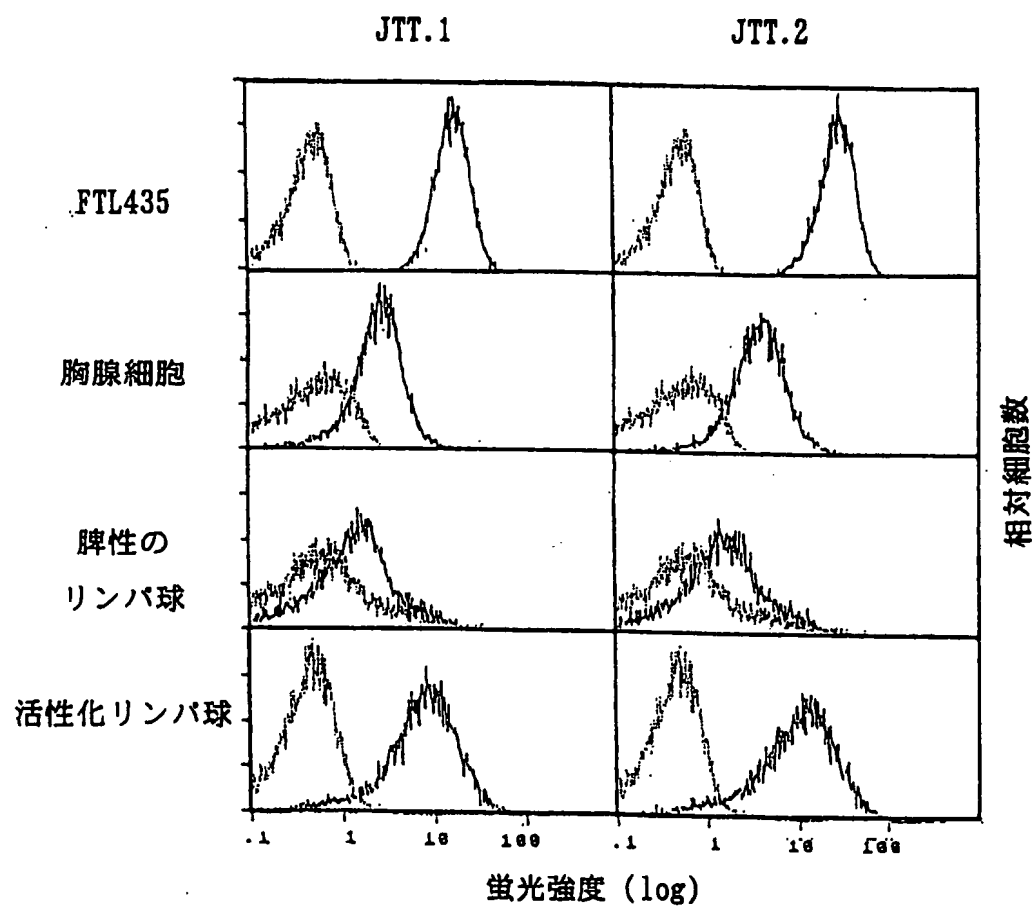


図 2



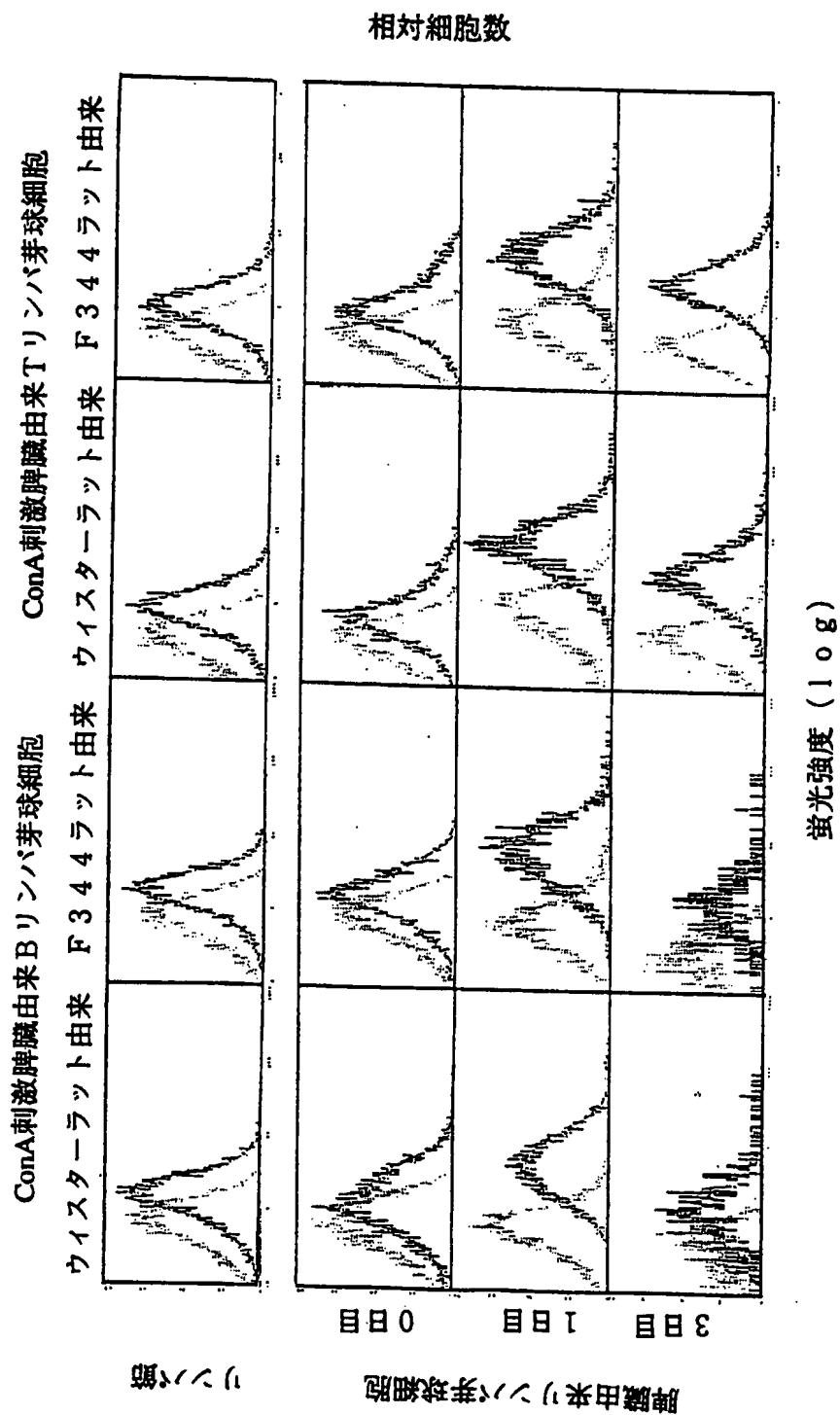
3 / 2 2

図 3



4 / 22

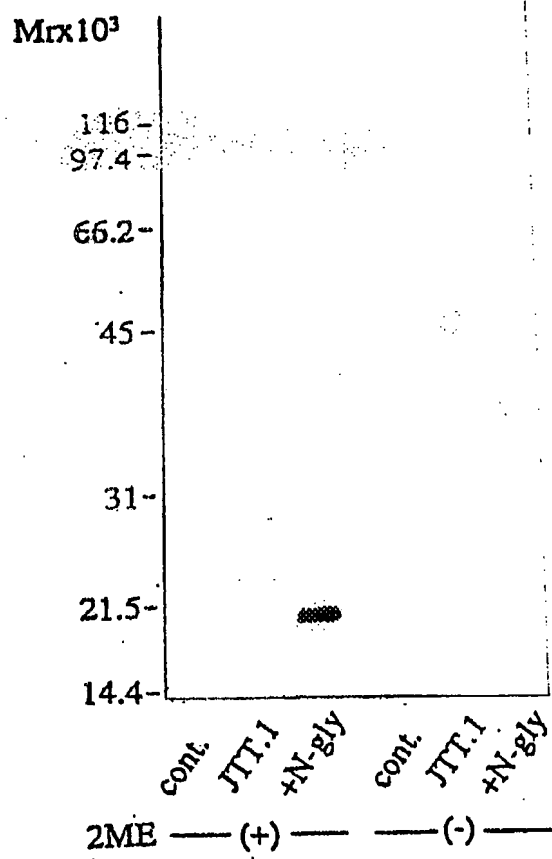
図 4





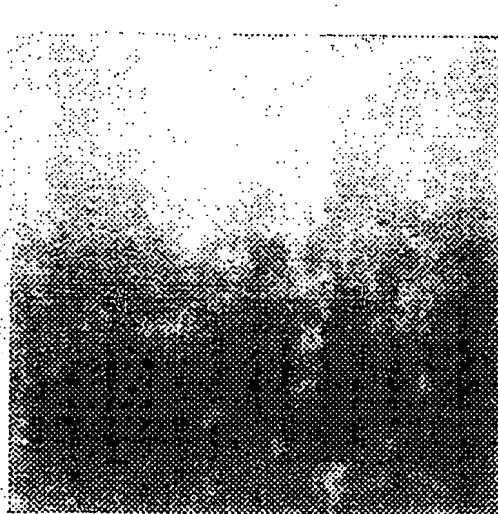
5 / 2 2

[X] 5

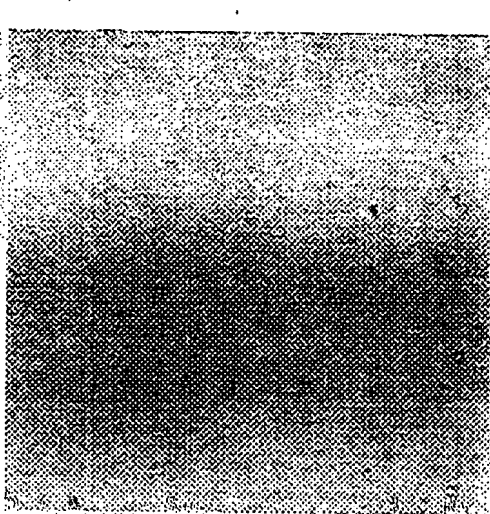


6 / 2 2

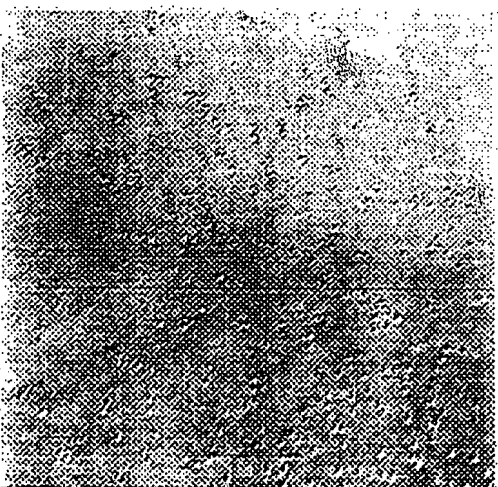
図 6



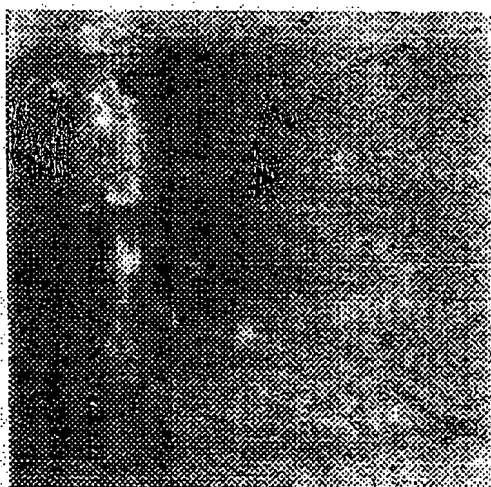
(a)



(b)



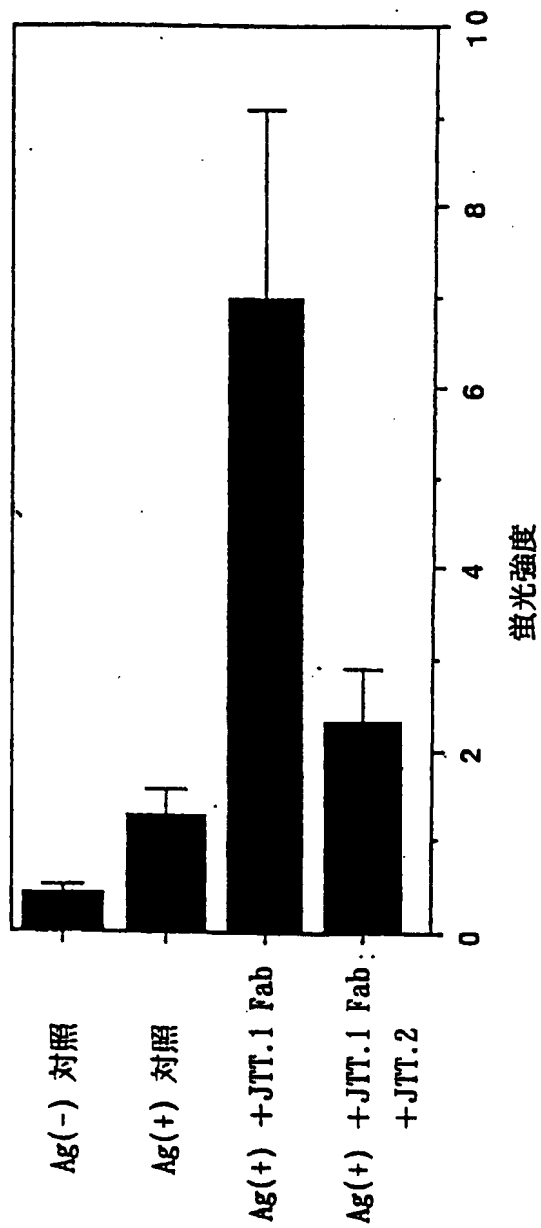
(c)



(d)

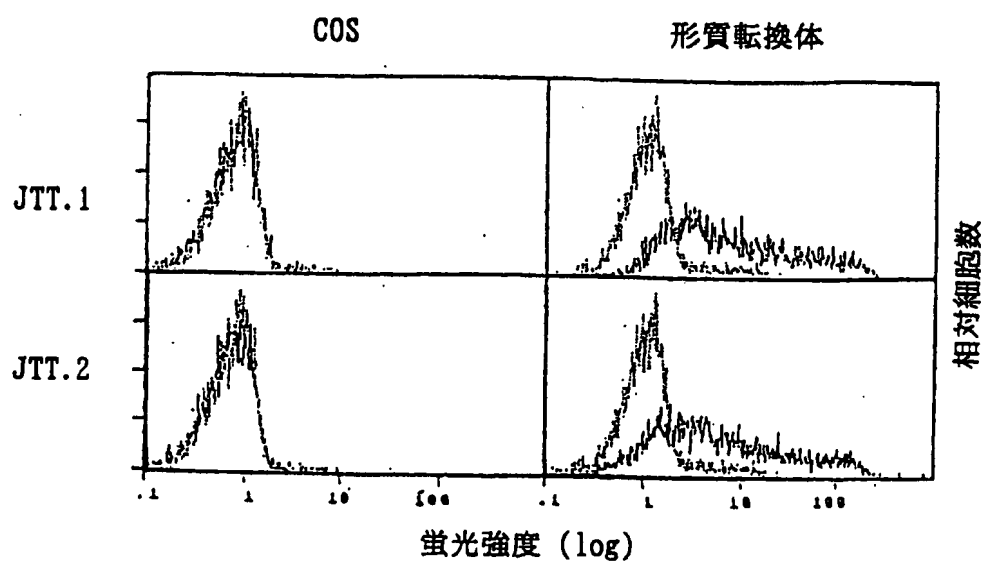
7/22

図 7



8 / 22

図 8



9/22

図 9

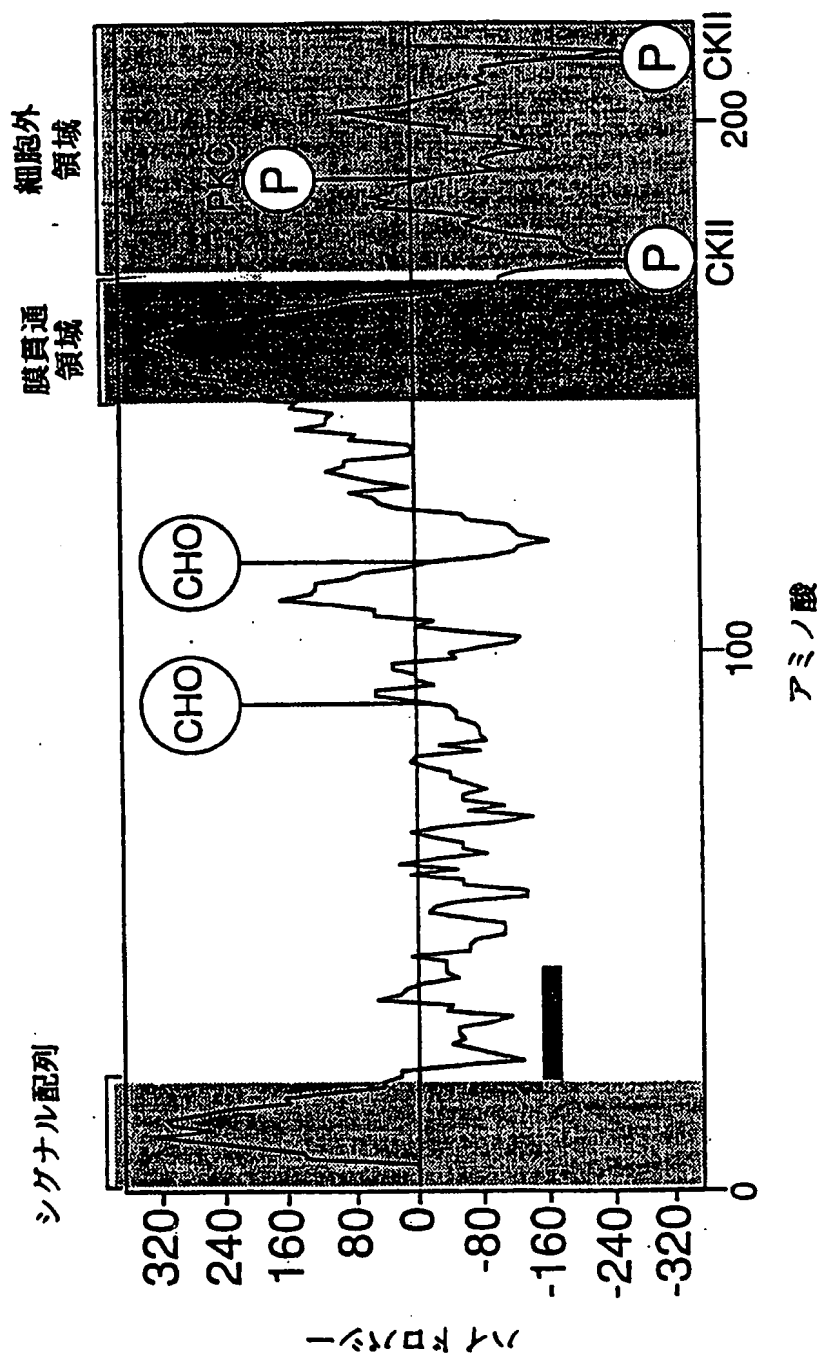


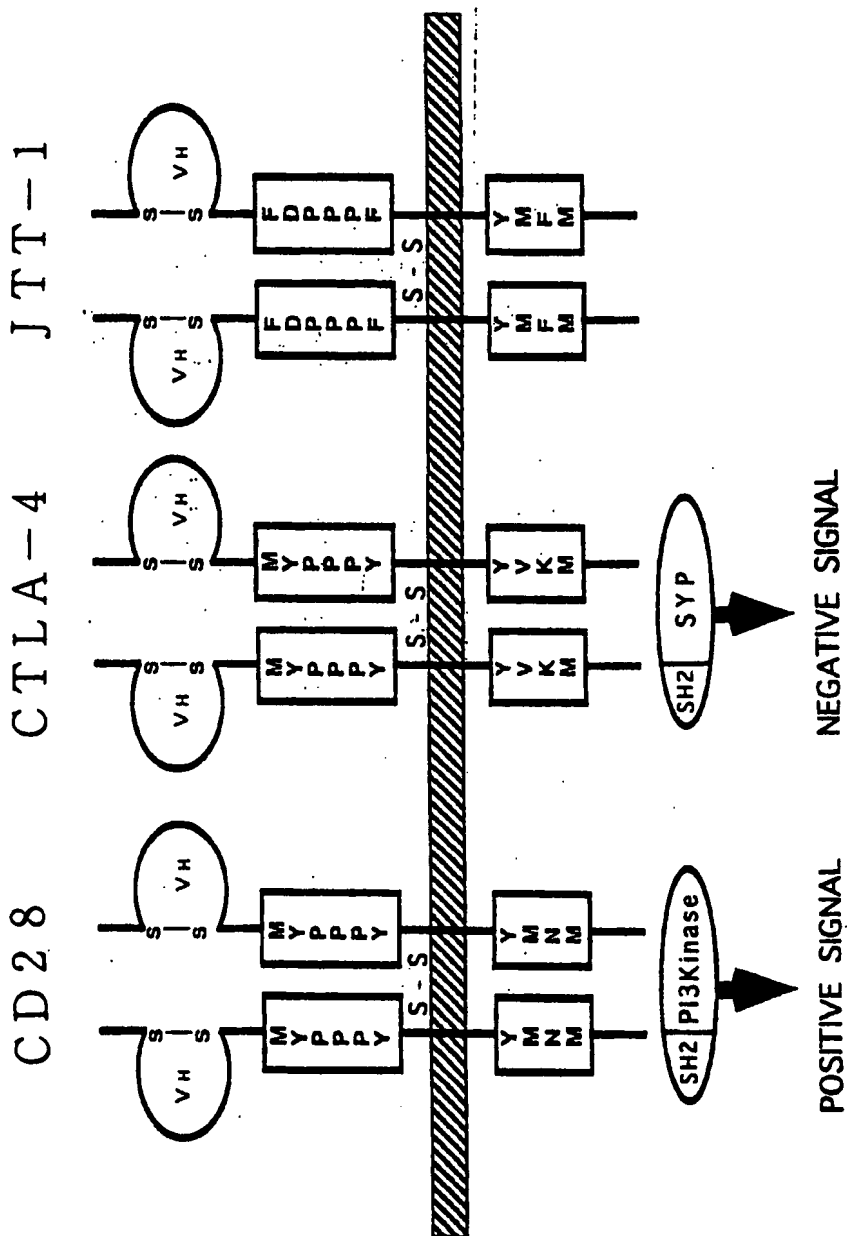


图 1 1

[illegible]

12/22

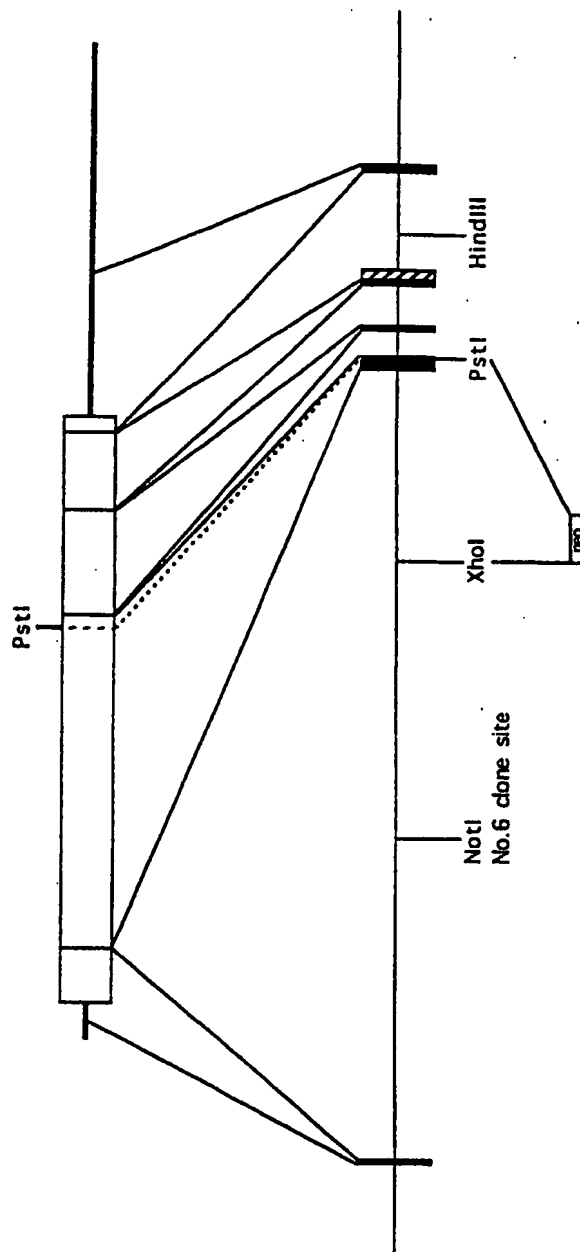
12





13/22

図 13

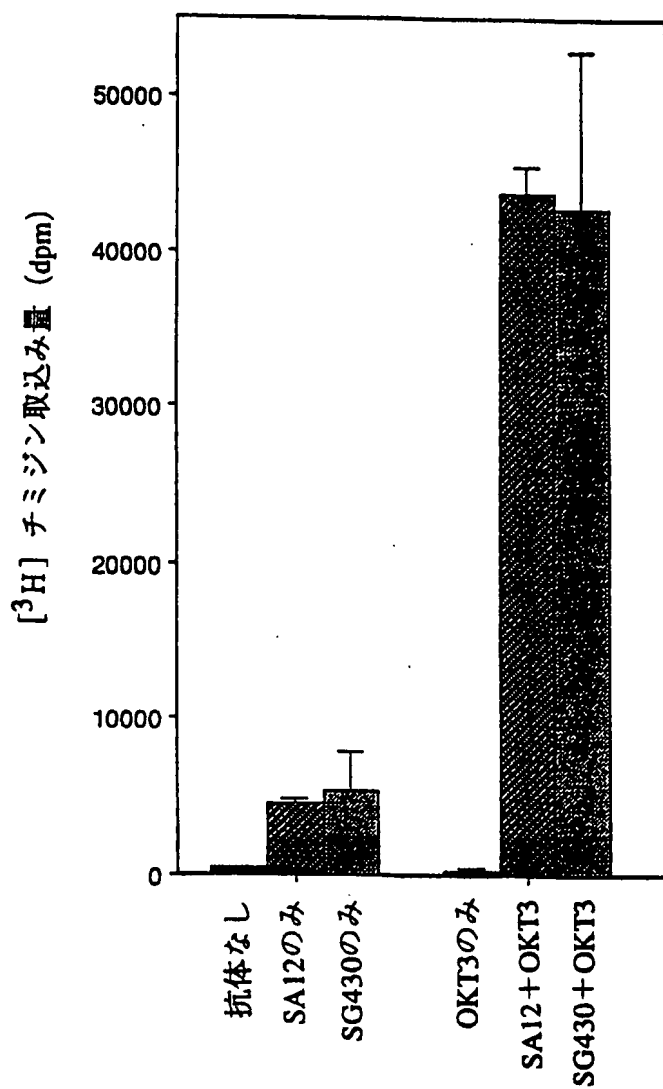


14

ラット ラット変異体 コンセンサス	MKPYFSCVFV FCFLIKLLTG ELNDLANHRM FSFHDGGVQI SCNYPETVQQ			50
	MKPYFSCVFV FCFLIKLLTG ELNDLANHRM FSFHDGGVQI SCNYPETVQQ			50
	MKPYFSCVFV FCFLIKLLTG ELNDLANHRM FSFHDGGVQI SCNYPETVQQ			50
ラット ラット変異体 コンセンサス	LKMQLFKDRE VLCDLTKTKG SGNTVSIKNP MSCPYQLSNN SVSFFLDNAD			100
	LKMQLFKDRE VLCDLTKTKG SGNTVSIKNP MSCPYQLSNN SVSFFLDNAD			100
	LKMQLFKDRE VLCDLTKTKG SGNTVSIKNP MSCPYQLSNN SVSFFLDNAD			100
ラット ラット変異体 コンセンサス	SSQGSYFLCS LSIFDPPPFQ EKNLSGGYLL IYESQLCCQL KLWLPVGCAA			150
	SSQGSYFLCS LSIFDPPPFQ EKNLSGGYLL IYESQLCCQL KLWLPVGCAA			150
	SSQGSYFLCS LSIFDPPPFQ EKNLSGGYLL IYESQLCCQL KLWLPVGCAA			150
ラット ラット変異体 コンセンサス	FVAALLFGCI FIVWFAKKY RSVHDPNSE YMFMAAVNTN KKSRLAG			200
	FVAALLFGCI FIVWFAKKY RSVHDPNSE YMFMAAVNTN KKSRLAG			200
	FVAALLFGCI FIVWFAKKY RSVHDPNSE YMFMAAVNTN KKSRLAG			200
ラット ラット変異体 コンセンサス	-----			200
	LRAIGRGEHS SCQDRN			216
	.....			216

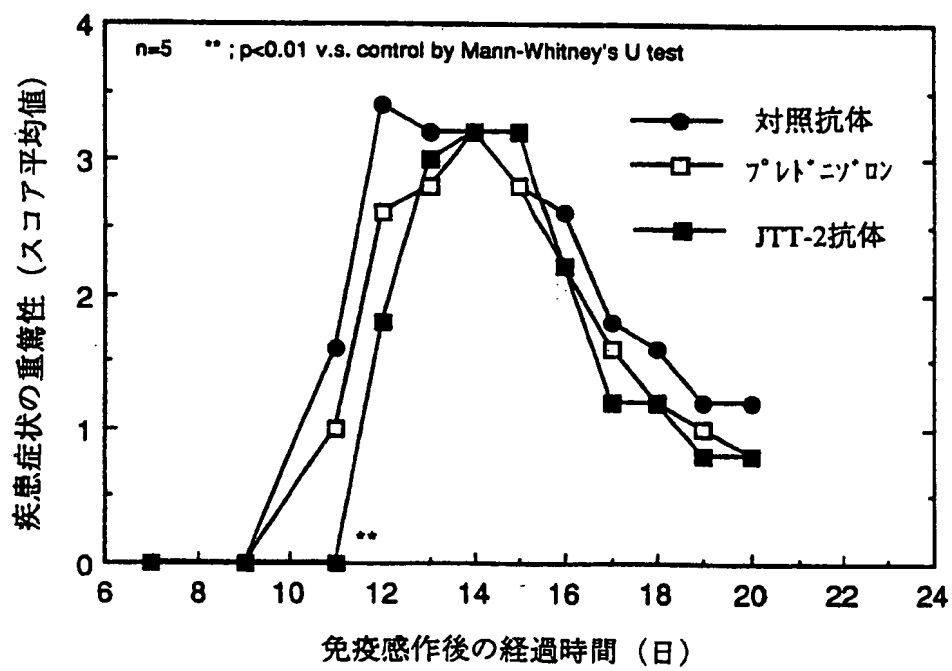
15 / 22

図 15



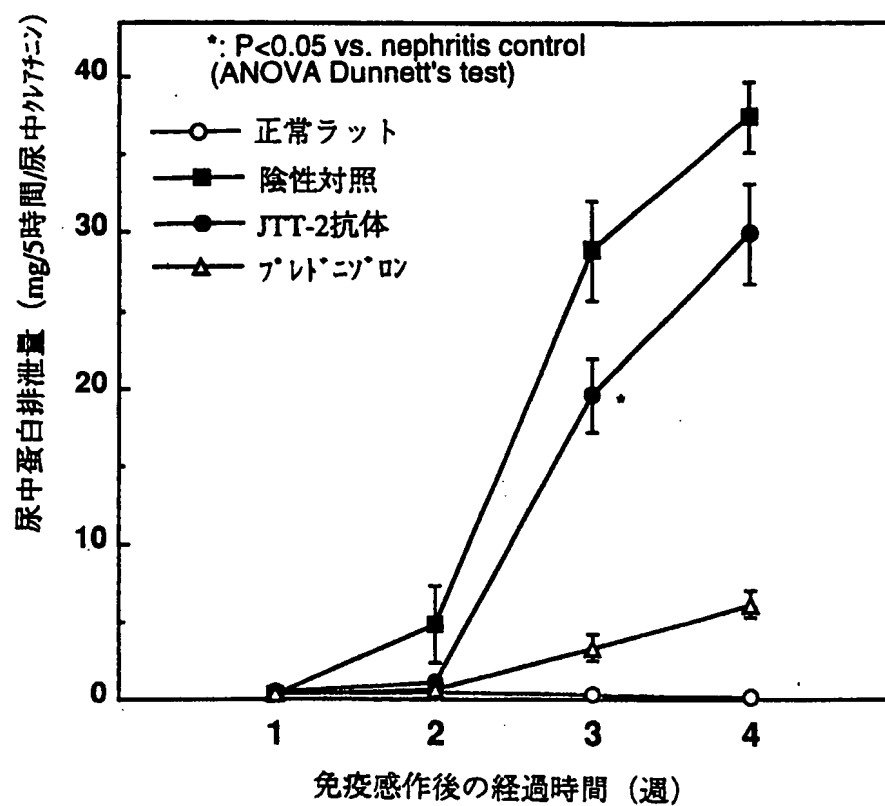
16/22

図16



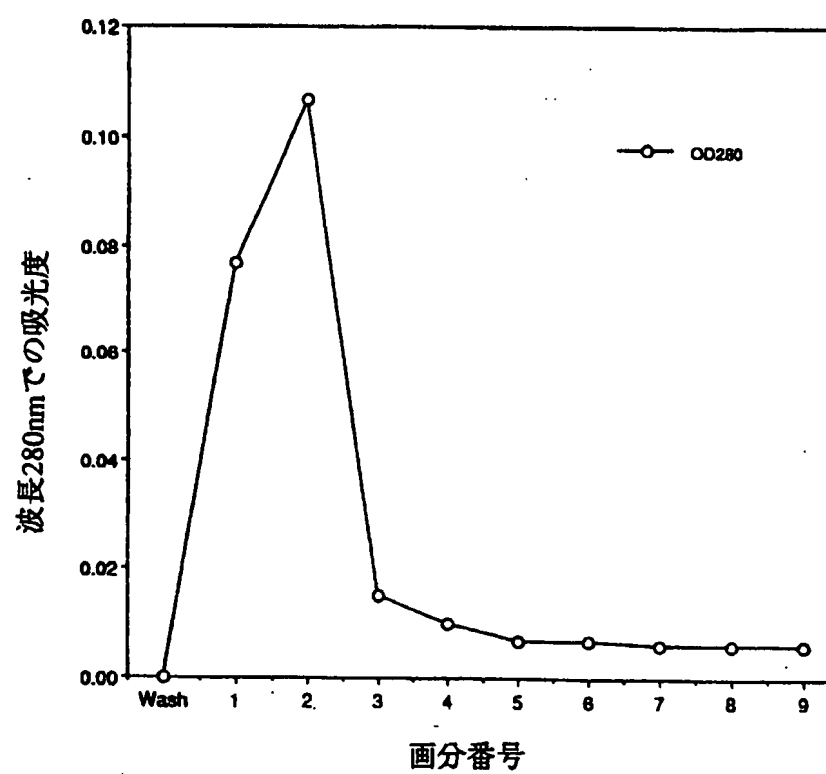
17 / 22

図 17



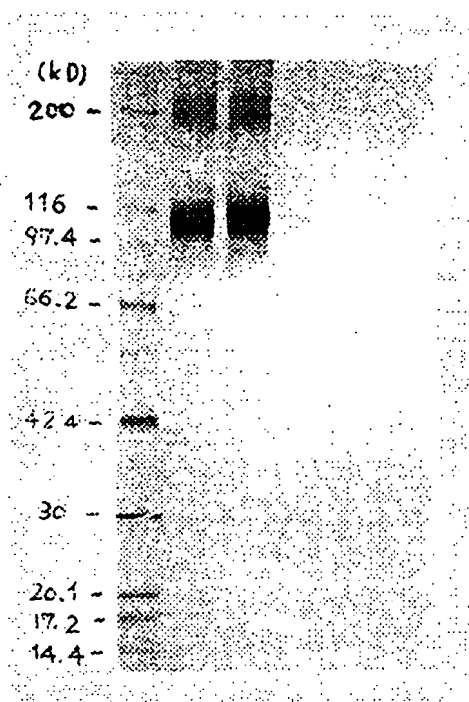
18/22

図 18



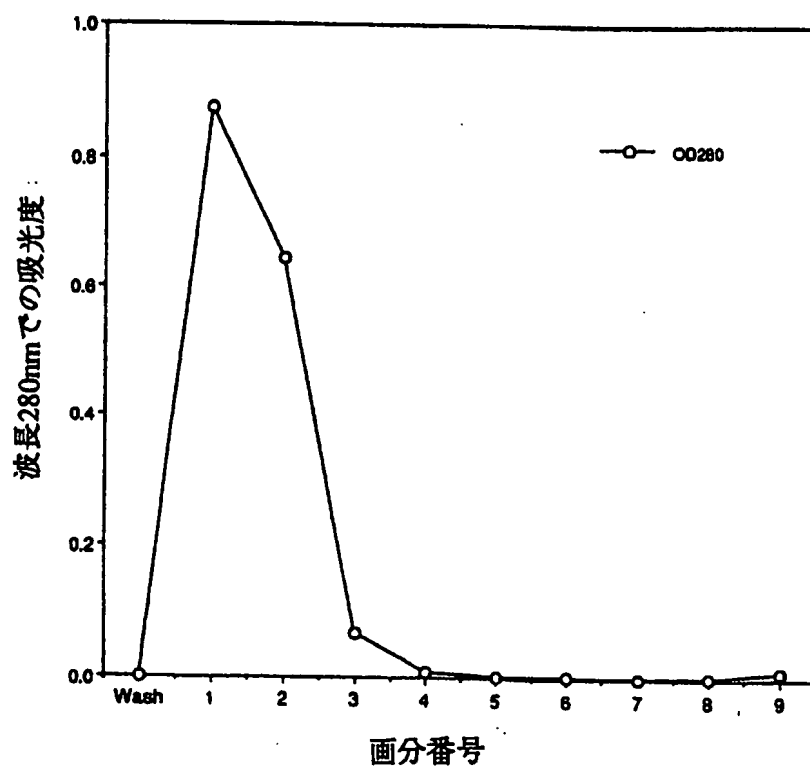
19/22

图 19



20/22

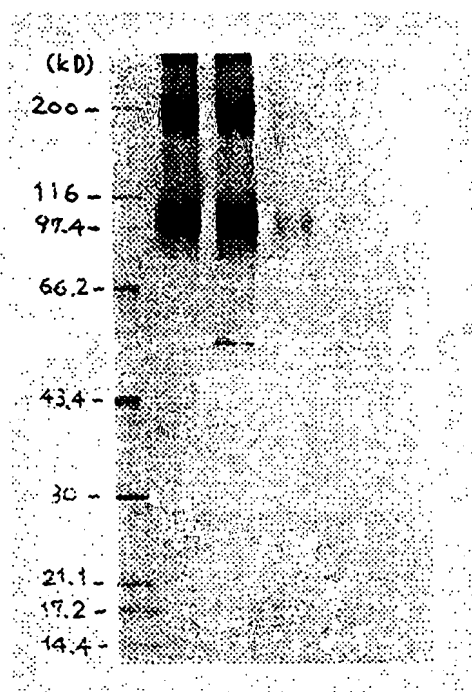
図 20





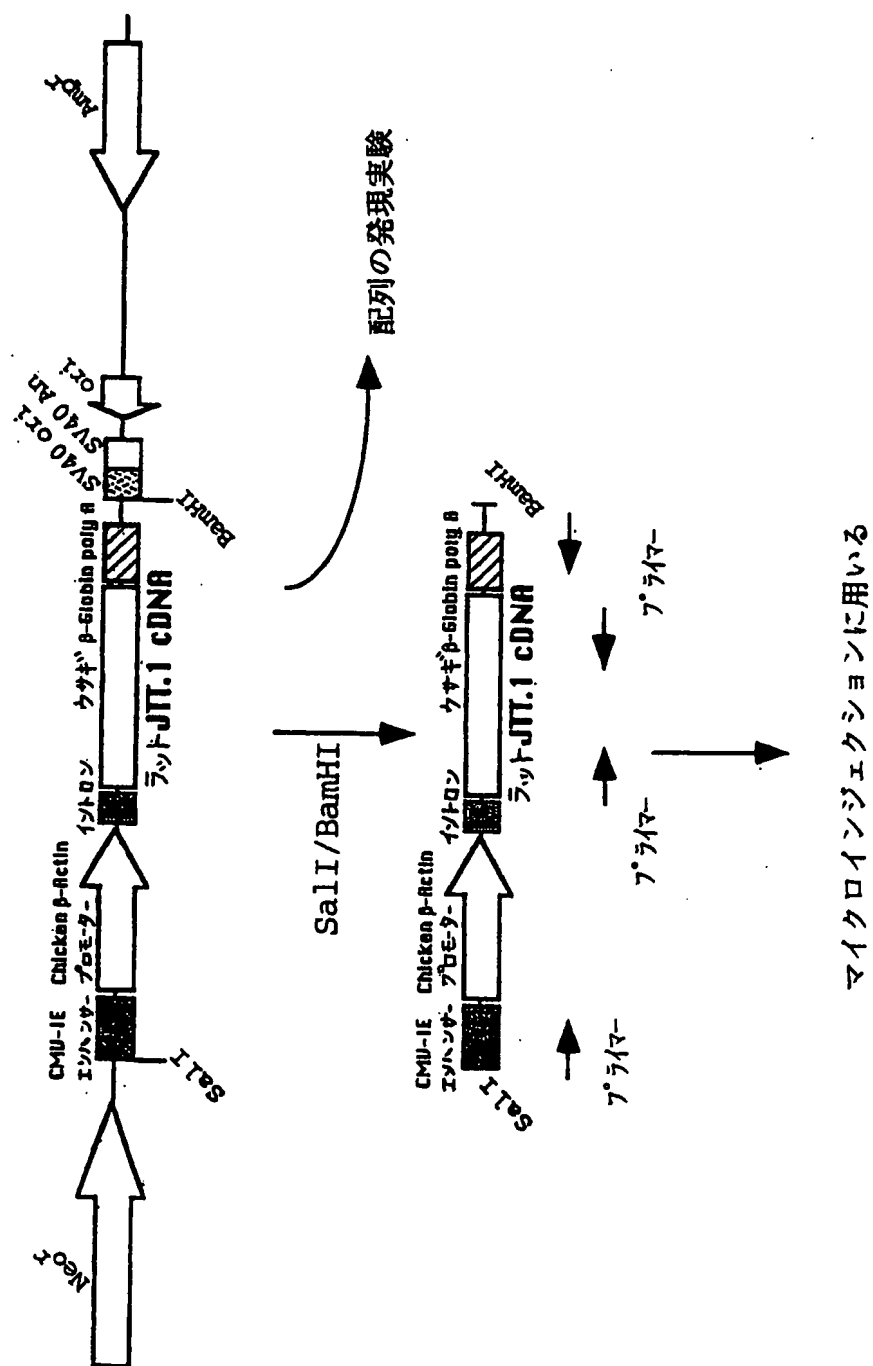
21/22

21



22 / 22

図 22



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00837

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C07K14/705, C07K16/28, C07K9/00, C12N5/10, C12N15/12, C12P21/08,  
A01K67/027, A61K38/17, A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C07K14/705, C07K16/28, C07K9/00, C12N5/10, C12N15/12, C12P21/08,  
A01K67/027, A61K38/17, A61K39/395

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG), GenBank/EMBL/DBJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PA	Experimental Cell Research, Vol. 235[1](1997-Aug) Robert J "Antibody cross-linking of the thymocyte-specific cell surface molecule CTX causes abnormal mitosis and multi-nucleation of tumor cells" p.227-237	1-36
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 90[2](1993) Heyeck S D et al., "Developmental Regulation of a Murine T-Cell-Specific Tyrosine Kinase Genetsk" p.669-673	1-36
A	J. Biol. Chem., Vol. 267[4](1992) Marguet D et al., "cDNA cloning for mouse thymocyte-activating molecule a multifunctional ecto-dipeptidyl peptidase IV CD26 included in a subgroup of serine proteases" p.2200-2208	1-36

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority  
date and not in conflict with the application but cited to understand  
the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive step  
when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such combination  
being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
May 8, 1998 (08. 05. 98)

Date of mailing of the international search report  
May 19, 1998 (19. 05. 98)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C07K14/705, C07K16/28, C07K9/00, C12N5/10, C12N15/12  
C12P21/08, A01K67/027, A61K38/17, A61K39/395

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C07K14/705, C07K16/28, C07K9/00, C12N5/10, C12N15/12  
C12P21/08, A01K67/027, A61K38/17, A61K39/395

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PA	Exprimental Cell Research, Vol. 235[1] (1997-Aug) Robert J 「Antibody cross-linking of the thymocyte-specific cell surface molecule CTX causes abnormal mitosis and multi- nucleation of tumor cells」 p. 227-237	1-36
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 90[2] (1993) Heyeck S D <i>et al.</i> 「Developmental Regulation of a Murine T-Cell-Specific Tyrosine Kinase Genetsk」 p. 669-673	1-36
A	J. Biol. Chem., Vol. 267[4] (1992) Marguet D <i>et al.</i> 「cDNA cloning for mouse thymocyte-activating molecule a multifunctional ecto-dipeptidyl peptidase IV CD26 included	1-36

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.05.98

国際調査報告の発送日

19.05.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上 條 肇

4B

9453

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	in a subgroup of serine proteases] p. 2200-2208	